# PARTE PRIMA

1

# Concetti e metodi dell'Embriologia sperimentale

Antonio Musarò

## CONCETTI GENERALI DELL'EMBRIOLOGIA

L'Embriologia, dal greco Εμβρυολογία, è lo studio dei processi biologici tramite i quali da una cellula uovo fecondata si forma un nuovo individuo.

Molti sono stati gli studiosi che, a partire da Aristotele e Galeno, hanno contribuito, con le loro scoperte, alla comprensione dei meccanismi che regolano lo sviluppo embrionale e a fornire le basi cellulari e molecolari della moderna Embriologia molecolare. L'Embriologia passa così da semplice materia descrittiva ad Embriologia sperimentale.

L'Embriologia sperimentale utilizza diversi approcci tecnologici e modelli animali. Ad esempio, nell'ambito dell'Embriologia sperimentale si è sviluppata l'Embriologia molecolare che ha come obiettivo principale lo studio dei geni nella regolazione dello sviluppo embrionale.

In questo contesto, la decodificazione del genoma umano ha rappresentato una delle sfide più importanti e promettenti della ricerca scientifica del XXI secolo ed un mezzo più immediato per la generazione di appropriati modelli sperimentali.

## INTRODUZIONE

Lo studio dello sviluppo embrionale trova le sue radici in epoca antica, in alcuni scritti di Aristotele e di Galeno, nei quali vengono descritte fasi di sviluppo di embrioni di pollo. Fu però a partire dal Seicento che gli studi embriologici divennero più sistematici. In particolare, il medico britannico William Harvey formulò l'ipotesi per cui lo sviluppo delle diverse parti del corpo avviene in modo graduale a partire da un uovo. Altri studiosi che si occuparono dell'argomento furono l'anatomista italiano Girolamo Fabrizio d'Acquapendente, il grande Leonardo da Vinci, il fisiologo Marcello Malpighi e il biologo Lazzaro Spallanzani. Questi scienziati posero le basi per lo sviluppo sia dell'Embriologia descrittiva che di quella sperimentale. Fino alla metà del secolo successivo, le idee di Harvey e dei suoi sostenitori furono in contrasto con l'idea del **preformismo**, che riteneva già presenti nell'uovo o nello spermatozoo tutte le strutture corporee. La teoria preformista fu sostenuta per la prima volta dall'olandese Jan Swammerdam il quale, nel *Miraculum naturae sive uteri muliebris fabrica* (1672) negò che negli insetti esistesse una vera metamorfosi: la farfalla, per esempio, per Swammerdam è già presente interamente, con i suoi organi già distinti, nelle uova del bruco. Secondo Swammerdam tutti i germi preesistevano dall'inizio del mondo, essendo la creazione un atto unico. Pertanto al momento della creazione nelle ovaie di Eva si trovavano, in miniatura, tutti gli uomini destinati a nascere fino alla fine del mondo. Lo sviluppo degli esseri viventi non era altro che lo svolgimento (in lingua latina *evolutio*) delle parti impacchettate nel germe, con successive mutazioni quantitative (accrescimento e allungamento). Il miglioramento del microscopio permise nuove e decisive osservazioni al biologo tedesco Kaspar Friedrich Wolff, che nel 1774 pubblicò la *Theoria generationis*, considerato il fondamento dell'Embriologia moderna; nel suo lavoro, si oppose alle idee dei preformisti e dimostrò la gradualità del processo di sviluppo embrionale (**epigenesi**).

Alla fine dell'Ottocento, utilizzando microscopi ottici sempre più perfezionati, si cominciò a descrivere dettagliatamente lo sviluppo degli embrioni di numerosi organismi con sviluppo esterno quali gli uccelli, gli anfibi, i rettili e i pesci. Mentre per gli embrioni a sviluppo interno gli studi andarono più lentamente, in quanto questi devono essere prelevati a tempi successivi, fissati e preparati opportunamente con i metodi dell'Istologia.

Nel 1914, Franz Keibel e Franklin Mall con circa 800 esemplari posero le basi per la più ampia collezione esistente di embrioni umani presso l'Istituto Carnegie di Washington a Baltimora negli Stati Uniti. Grazie a George L. Streeter e Ronan O'Rahilly, tra il 1940 e il 1955, la collezione raccolse più di 10.000 embrioni.

Alle descrizioni morfologiche dello sviluppo degli embrioni si affiancò presto lo studio delle cause e dei meccanismi che controllano lo sviluppo embrionale. Per esempio, si era osservato che dall'ectoderma dorsale di

**Figura 1-1** ■ Esperimento di Spemann-Mangold su *Xenopus laevis* per studiare i meccanismi di induzione molecolare di strutture embrionali. L'esperimento effettuato da Hans Spemann e Hilde Mangold nel 1924 è consistito nel trapiantare un piccolo frammento di mesoderma dorsale nella regione dell'ectoderma ventrale della gastrula. Gli autori dimostrarono che la formazione della placca neurale era indotta dal mesoderma sottostante, definito come l'organizzatore. La placca neurale indotta era in grado di dare origine ad un secondo embrione e quindi ad un girino con due corpi sovrapposti.

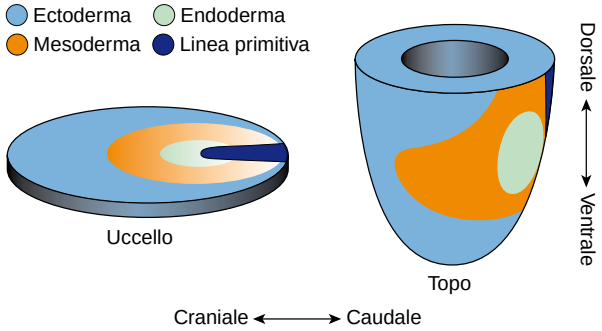



**Figura 1-2** ■ Rappresentazione schematica delle mappe differenziative in un embrione di pollo e uno di topo allo stadio iniziale della gastrulazione. La figura mostra la posizione dei tre foglietti embrionali primari: ectoderma, mesoderma ed endoderma, nell'embrione degli uccelli e del topo, da cui origineranno i diversi tessuti, organi e apparati del corpo. I dettagli dei processi morfogenetici sono descritti negli specifici capitoli.

tutti gli embrioni dei vertebrati si formava una struttura tubulare che dava origine al sistema nervoso centrale. Ci si chiese quali fattori controllassero nello spazio e nel tempo questo processo. L'approccio sperimentale fu allora quello della **microchirurgia embrionale**, rimuovere o spostare abbozzi di organi in una determinata regione dell'embrione e in un definito momento dello sviluppo. Si osservò così che il tubo neurale si formava in una regione dell'ectoderma situata al di sopra di un sottile cordoncino di cellule chiamato notocorda e che questa, se spostata in un'altra regione dell'embrione, era in grado per un certo arco di tempo di stimolare qualsiasi regione dell'ectoderma soprastante a formare tubo neurale (Fig. 1-1). Questo fenomeno fu chiamato **induzione** ed era chiaro che dipendeva da uno o più fattori prodotti dalla notocorda. Per la caratterizzazione molecolare di tali fattori si cominciò a sperimentare l'effetto di svariati composti sullo sviluppo dell'ectoderma dando inizio all'**Embriologia Molecolare**. Per certi esperimenti e soprattutto per gli studi su embrioni a sviluppo interno, si rese necessario escogitare metodi di espianto di tessuti e di cellule e della loro **coltura in vitro**.

Dalla fine dell'Ottocento ad oggi, fondamentali per il progresso dell'Embriologia sono stati gli studi delle **mappe differenziative** (fate maps) e del **differenziamento di linee cellulari** (cell lineage) (Fig. 1-2). Scopo di questi studi era ed è seguire il destino differenziativo di regioni e di specifiche popolazioni cellulari dell'embrione. Nel corso degli anni, di pari passo al progredire delle tecniche di biologia cellulare e molecolare, si sono utilizzati diversi metodi che permettono di marcare i tessuti e le cellule oggetto di studio. Oggi, utilizzando marcature con molecole fluorescenti vitali e speciali microscopi ottici, è possibile seguire per qualche tempo lo spostamento di tessuti e cellule in tempo reale in embrioni di piccole dimensioni o in frammenti di essi in coltura.

In questa introduzione ci siamo limitati ad una breve descrizione delle origini dell'Embriologia e di quelli che sono stati i metodi più importanti applicati inizialmente allo studio di questa affascinante materia. Nel resto di questo capitolo descriveremo in maggiore dettaglio alcuni dei metodi dell'Embriologia sperimentale nelle loro versioni più moderne ed altri che sono stati sviluppati più di recente allo scopo di individuare, sempre con maggiore dettaglio, i segnali molecolari e i geni che governano lo sviluppo di un embrione.

## COLTURE IN VITRO

Un paradigma importante della ricerca applicata stabilisce che, al fine di studiare un problema biologico, è necessario identificare un modello sperimentale valido e appropriato. Come verrà discusso in seguito, l'utilizzo di approcci sperimentali, quali **gene knock out** (eliminazione di un gene), **mutagenesi condizionale** e **transgenesi**, ha contribuito enormemente allo sviluppo dell'Embriologia sperimentale, rivelando il ruolo critico di specifici geni nelle diverse fasi dello sviluppo embrionale e nell'omeostasi tissutale.

Tuttavia, accanto a queste tecniche di **gene targeting**, l'Istologia e l'Embriologia sperimentale hanno utilizzato tecniche di **colture cellulari** che meglio si prestano ad analizzare, caratterizzare e modulare, in tutti i suoi aspetti, le diverse vie di trasduzione del segnale che mediano una specifica risposta cellulare, come la proliferazione, il differenziamento, l'apoptosi o la sopravvivenza cellulare.

Da diverso tempo si è adottata la tecnica delle **colture d'organo** o di **frammenti di tessuti** basate sul prelievo di piccoli organi embrionali o di frammenti tissutali da coltivare in vitro. Il vantaggio di queste tecniche si basa

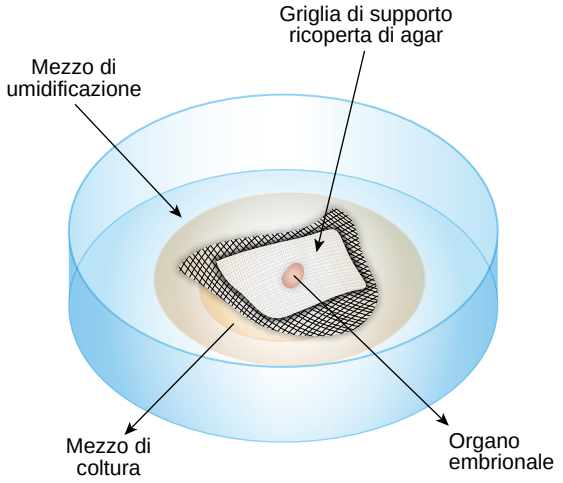



**Figura 1-3** ■ Rappresentazione schematica di allestimento di una coltura d'organo. La tecnica consiste nell'asportare dall'organismo l'abbozzo di un organo embrionale o un frammento di organo adulto e adagiato su una griglia di supporto ricoperta di agar, all'interno di una piastra, ricoperta di mezzo di coltura.

sulla possibilità di preservare l'architettura tissutale in vitro e di mantenere le interazioni cellula-cellula che giocano un ruolo chiave nella funzione tissutale. Per esempio colture d'organo ottenute da testicoli di ratto immaturo hanno permesso di analizzare i meccanismi molecolari che regolano la cinetica di proliferazione delle cellule del Sertoli, la funzione delle cellule di Leydig e il differenziamento di cellule spermatogoniali (Fig. 1-3).

Tuttavia queste tecniche presentano alcune limitazioni dovute soprattutto sull'impossibilità di effettuare colture per lunghi periodi di tempo a causa principalmente di problemi di ossigenazione dei tessuti. Inoltre, a volte è utile saggiare il comportamento di singole popolazioni cellulari, piuttosto che aggregati di cellule diverse. A questo scopo si utilizzano colture cellulari in cui una porzione di tessuto prelevata da un organismo adulto o allo stadio di embrione, viene disgregata con enzimi (tripsina, collagenasi, dispasi), e separata in singole cellule. Si parla in questo contesto di allestimento di **colture primarie** di cellule monodisperse. Il procedimento, rispetto al precedente, offre il vantaggio di isolare le cellule e di ottenere da esse colture di specifici tipi cellulari. Nei frammenti di tessuto, infatti, sono spesso presenti molteplici tipi cellulari, che danno luogo a colture miste.

Negli anni si sono sempre più affinate le tecniche di isolamento e coltura di vari tipi cellulari. In ogni modo, per procedere all'isolamento di una coltura primaria è necessario effettuare 3 passaggi principali:

- dissezionare il tessuto per isolare le diverse popolazioni cellulari;
- arricchire la frazione cellulare di interesse;
- mantenere le cellule isolate in opportuni terreni di crescita.

Occorre tener presente che in genere un tessuto è composto di tipi cellulari diversi, tenuti insieme da molecole adesive e da matrice extracellulare, una complessa mistura di proteine, molecole di adesione e di norma glicoproteine e proteoglicani. Di conseguenza è necessario rompere l'adesione tra le cellule e degradare la matrice per isolare efficientemente le cellule, senza tuttavia alterare le strutture cellulari. A tale scopo si utilizza una mistura di enzimi proteolitici, quali tripsina, collagenasi, dispasi e/o soluzioni saline prive di ioni $Ca^{2+}$, richiesta per dissociare le cellule di un tessuto. Dopo la dissociazione, è di norma necessario arricchire la coltura cellulare di un solo specifico tipo cellulare. A tale scopo possono essere utilizzati diversi metodi, dalla centrifugazione differenziale al "pre-plating", dal gradiente di Percoll al FACS sorter (Fig. 1-4). Il **pre-piastramento** (pre-plating) è utile per esempio nell'allestimento di colture primarie di cellule satelliti da un muscolo. Il tessuto muscolare viene disgregato in modo da ottenere una popolazione composta principalmente da fibroblasti (cellule del connettivo) e cellule satelliti (il compartimento staminale classico del muscolo scheletrico) oltre che cellule endoteliali. È fondamentale quindi, per allestire una coltura di cellule satelliti, liberarsi soprattutto dei fibroblasti. In questo contesto, si effettua il pre-plating delle cellule dissociate. Questo metodo sfrutta "l'avidità" dei fibroblasti di aderire alla piastra molto più efficacemente delle cellule satelliti (Fig. 1-4, passaggi 2 e 3). Dopo circa un'ora si prelevano dalla piastra le cellule rimaste in sospensione (principalmente cellule satelliti) e si ri-piastrano su specifici substrati, come ad esempio il collagene, che facilitano l'adesione cellulare (Fig. 1-4, passaggi 2 e 4).

La Figura 1-5 mostra un esempio di coltura primaria di cellule satelliti prima e dopo pre-plating.

Un altro metodo che permette di isolare specifiche e selezionate popolazioni cellulari è la **citofluorimetria a flusso** associata a sorting (smistamento/separazione) cellulare (FACS, fluorescence associated cell sorting).

La citofluorimetria consente lo studio di un gran numero di parametri cellulari quali le dimensioni, il ciclo replicativo e le caratteristiche del DNA, il riconoscimento e la quantificazione di caratteristiche (markers) biochimiche sia strutturali che metaboliche delle cellule. Le diverse popolazioni cellulari sono caratterizzate dall'espressione più o meno selettiva di antigeni (molecole in grado di stimolare la produzione di anticorpi in individui diversi della stessa specie o di specie diverse), per esempio proteine trans-membrana. Utilizzando degli anticorpi diretti selettivamente contro questi antigeni coniugati a molecole fluorescenti (fluorocromi), si può "marcare" una specifica popolazione cellulare e poi isolarla mediante FACS-sorting. In particolare, le cellule vengono fatte passare attraverso una cella a quarzo in cui vengono colpite da un raggio laser. Un sistema di sensori e fotomoltiplicatori processa quindi il segnale fluorescente generato da ogni singola cellula o nucleo (evento) convertendolo in un segnale elettronico che viene analizzato da un apposito software informatico. Le cellule possono inoltre venire separate e raccolte in distinte provette o terreni di coltura.

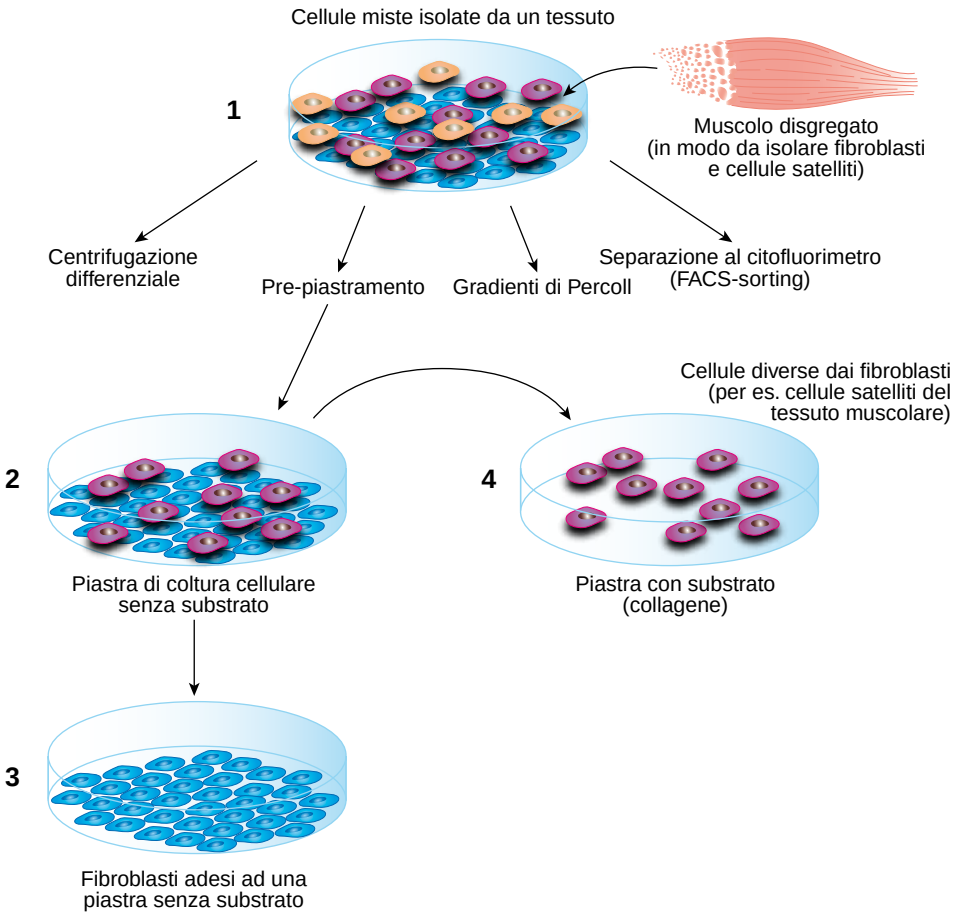



**Figura 1-4** ■ Rappresentazione schematica di tecniche di allestimento di colture cellulari primarie. Il tessuto viene disgregato con enzimi proteolitici e/o soluzioni saline prive di ioni $Ca^{2+}$ che servono a degradare la matrice extracellulare e rompere i complessi adesivi cellula-cellula. Una volta dissociate *(1)*, le cellule possono essere separate mediante diversi approcci tecnici, come la centrifugazione differenziale, il pre-piastramento, i gradienti di Percoll e la separazione al citofluorimetro (FACS sorting). Questi metodi permettono di arricchire la coltura cellulare di un particolare tipo di cellule. In particolare, il pre-plating *(2)* sfrutta l'avidità di alcuni tipi cellulari, come i fibroblasti, di aderire velocemente alla piastra *(3)*, mentre altre cellule, in questo caso le cellule satelliti, rimangono in sospensione. Queste ultime vengono quindi raccolte e seminate in una piastra trattata con proteine (per esempio, collagene, laminina o fibronectina), che ne favoriscono l'adesione *(4)*.

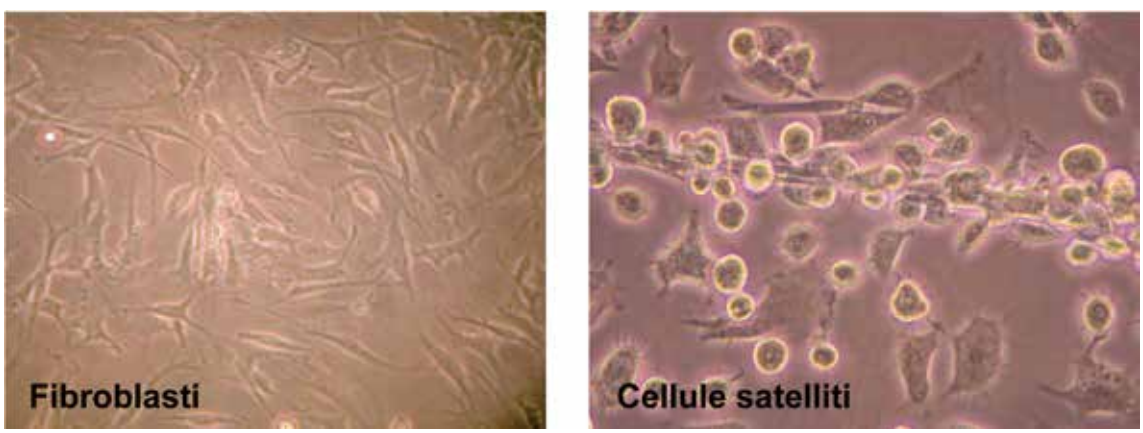



**Figura 1-5** ■ Esempio di coltura primaria per l'isolamento di cellule satelliti. Il pannello di sinistra mostra il risultato del pre-plating: più dell'80% della coltura è rappresentata dai fibroblasti, mentre il pannello di destra mostra una coltura arricchita di cellule satelliti, piastrate su un substrato, come ad esempio il collagene, che ne favorisce l'adesione.

Uno dei limiti delle colture cellulari primarie è che dopo un certo numero di duplicazioni (variabile per tipo cellulare), le cellule smettono di dividersi e muoiono generalmente a causa dell'accorciamento dei telomeri (senescenza replicativa). I telomeri sono i segmenti terminali di un filamento di DNA. Nel corso della duplicazione del DNA, che precede ogni mitosi, i telomeri si accorciano, a meno che l'enzima telomerasi non ne mantenga costante la lunghezza. Per ottenere una **linea cellulare** "stabile", capace di proliferare illimitatamente (linea cellulare continua), è necessario immortalizzare la coltura. A tale scopo si possono utilizzare diversi metodi, per esempio: favorire l'espressione del gene che codifica per la subunità catalitica della telomerasi, oppure inserire nelle cellule oncogeni derivati da virus tumorali (antigene T di SV40), che innescano meccanismi di trasformazione simili a quelli che determinano la proliferazione tumorale. Un altro vantaggio nell'utilizzo di una linea cellulare immortalizzata è di ridurre la variabilità sperimentale legata all'utilizzo di colture primarie garantendo maggiore riproducibilità. Tuttavia, è fondamentale tenere presente che la coltura immortalizzata può assumere caratteristiche fisiologiche diverse, rispetto alla coltura primaria, del tessuto di origine.

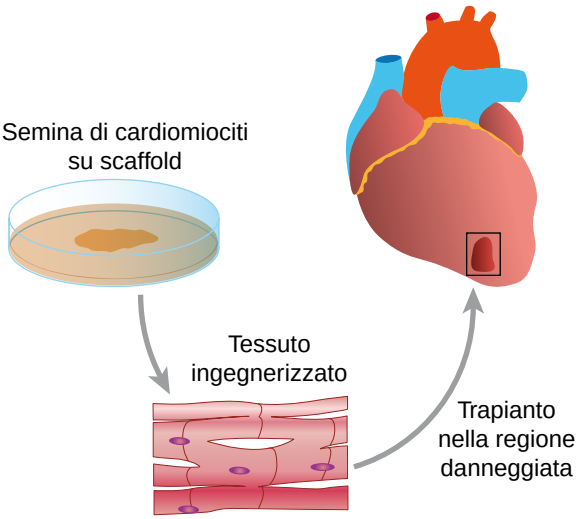



**Figura 1-6** ■ Rappresentazione schematica della tecnica di ingegneria tissutale. Cardiomiociti si possono isolare dal muscolo cardiaco e coltivare su una matrice tridimensionale (scaffold). Una volta ottenuto il tessuto ingegnerizzato si può impiantare nella regione del cuore danneggiata.

## L'INGEGNERIA TISSUTALE

Negli ultimi anni, grazie soprattutto all'isolamento e caratterizzazione di diverse popolazioni di cellule staminali (vedi Capitolo 4), si è sviluppato un nuovo filone di applicazione delle colture cellulari, basato sull'ingegneria tissutale.

Il termine **ingegneria tissutale** è stato introdotto nel 1987 dai membri della "US National Science Foundation" (NSF) a Washington D.C. ed è stata definita come "l'applicazione dei principi e dei metodi dell'ingegneria e delle scienze della vita finalizzata alla comprensione della relazione tra la struttura e la funzione dei tessuti animali e allo sviluppo di sostituti biologici per ripristinare, mantenere, o migliorare le funzioni tissutali".

L'ingegneria tissutale ha come finalità la realizzazione in vitro di tessuti 3D tali da rispettare le specifiche di forma, dimensioni, funzionalità meccanica e compatibilità biologica richieste (Fig. 1-6).

L'obiettivo dell'ingegneria tissutale è quindi lo sviluppo di costrutti vitali capaci di supportare, sostenere e ripristinare la funzionalità di organi e tessuti danneggiati o affetti da patologie; essa si basa sull'applicazione dei principi di discipline quali la Biologia, la Medicina e l'Ingegneria.

Fino ad oggi sono stati realizzati diversi costrutti tridimensionali per esempio da colture di tessuti osseo, epidermico, epatico, vascolare e pancreatico; questi "organoidi" presentano interessanti applicazioni che spaziano dai test funzionali e farmacologici in vitro ai trapianti in vivo.

La creazione di costrutti 3D di diversi tipi tissutali, come muscolo scheletrico e cardiaco, è tra i settori d'interesse più promettenti nell'ambito dell'ingegneria tissutale e fornisce un ampio spettro di possibili campi d'applicazione tra cui la diagnostica clinica e la possibilità di effettuare test commerciali di tossicità di farmaci sullo sviluppo e sulle proprietà funzionali di un determinato tessuto.

Tra le numerose applicazioni il trapianto in vivo è sicuramente quella più affascinante e di maggior interesse clinico. La tecnica del trapianto di un costrutto 3D oltre ad offrire la possibilità di introdurre nel paziente una quantità maggiore di cellule, permette l'inserimento di un tessuto già organizzato.

La maggioranza delle tecniche di ingegneria tissutale utilizza una struttura artificiale detta **scaffold** (impalcatura) per farvi aderire le cellule al fine di formare un tessuto tridimensionale.

Le matrici utilizzate come scaffold sono progettate per rispondere a specifiche richieste di forma e d'applicazione e sono fabbricate con una varietà di **biomateriali** come biopolimeri, polimeri sintetici, ceramiche e metalli.

Lo scaffold deve possedere una serie di requisiti specifici:

- deve prevedere un'ampia superficie di scambio tra cellule e polimero e uno spazio sufficiente per la produzione di matrice extracellulare;
- deve essere riassorbibile dall'organismo una volta compiuta la funzione strutturale;
- deve risultare biocompatibile e permettere la vascolarizzazione del tessuto;
- la percentuale di materiale dell'impalcatura all'interno del tessuto ingegnerizzato dovrebbe essere ridotta al minimo in modo da permettere la contrazione del tessuto.

Il grande vantaggio dell'utilizzo degli scaffolds è quello di conferire al costrutto tissutale una migliore in-

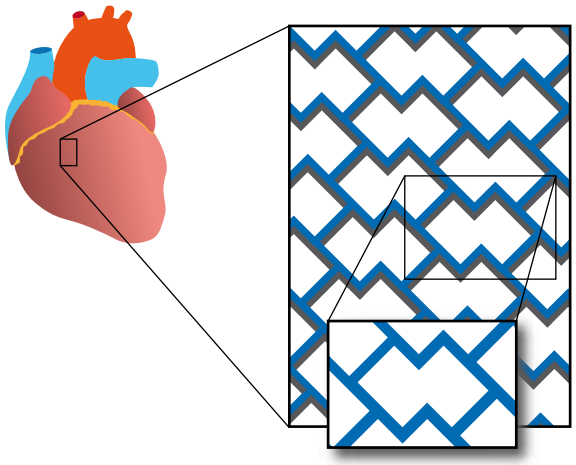


**Figura 1-7** ■ Illustrazione schematica che mostra il disegno della microstruttura a nido d'ape e simil-fisarmonica di uno scaffold ideale per ottenere un tessuto cardiaco ingegnerizzato con proprietà morfologiche e funzionali molto più vicine al tessuto cardiaco originale.

tegrità strutturale e di offrire la possibilità di manipolare tridimensionalmente questi materiali modificandone la forma e le dimensioni sia a livello macroscopico, che microscopico. È possibile infatti pensare di fabbricare lo scaffold ideale tramite una tecnica di computer design e, successivamente, fare aderire sul supporto le cellule.

Questa tecnica si è rivelata molto vantaggiosa per esempio per generare un tessuto cardiaco ingegnerizzato che potesse integrarsi e funzionare molto più efficientemente rispetto a diversi tipi di scaffolds. In particolare, il miocardio è descritto come un tessuto anisotropo, con proprietà meccaniche duttili, dettate dall'orientamento delle fibre muscolari cardiache (un materiale è anisotropo se le sue caratteristiche fisiche, come conducibilità elettrica e termica, proprietà ottiche o il suo comportamento meccanico, come rigidezza, resistenza, tenacità, sono differenti in direzione longitudinale e trasversale).

È stata quindi utilizzata una tecnica per fabbricare una microstruttura a nido d'ape e simil-fisarmonica (Fig. 1-7), su cui sono stati poi piastrati i cardiomiociti neonatali di ratto. Questa struttura ha mostrato proprietà meccaniche molto simili a quelle del miocardio originale.

## TECNICHE DI LOCALIZZAZIONE MOLECOLARE

### Istochimica e immunolocalizzazione

Il nostro organismo e le cellule in esso presenti sono costituite al 70% di acqua e l'organizzazione delle molecole al loro interno è tale da renderle traslucide. Essendo sostanzialmente trasparenti, cioè completamente attraversabili dai raggi di luce, le molecole, e molte delle strutture cellulari (organelli) da esse formate, sono quindi invisibili al microscopio. Per questo motivo sono state individuate, fin dagli inizi del XVII secolo, una serie di sostanze capaci di colorare varie porzioni o specifiche molecole della cellula, rendendole così visibili (**isto-citochimica**). Ad esempio i **coloranti basici** come l'ematossilina, hanno un'affinità per molecole acide come il DNA (acido desossiribonucleico) e **coloranti acidi**, come l'eosina si legano a molecole basiche, come molte proteine citoplasmatiche. Queste caratteristiche tintoriali hanno quindi portato a definire alcune strutture cellulari o extracellulari come acidofile o basofile, in base alla loro colorabilità con coloranti acidi o basici rispettivamente. I coloranti tuttavia non offrono in generale la garanzia di legare in maniera specifica un particolare tipo di molecola.

A tale scopo, si ricorre a **tecniche di immunolocalizzazione** che sfruttano la capacità degli **anticorpi** di distinguere differenze anche minime tra una molecola e l'altra. Gli anticorpi sono proteine normalmente prodotte dai linfociti B degli animali superiori per la difesa verso molecole estranee (antigeni) che penetrano nell'organismo. Essi sono in grado di legarsi ad un antigene in maniera specifica, discriminando piccolissime differenze nella struttura molecolare. Iniettando in animali la molecola da studiare, si inducono i loro linfociti a reagire contro questa molecola a loro estranea, producendo anticorpi che specificamente la riconoscono. Dal sangue di questi animali è quindi possibile isolare gli anticorpi prodotti dai vari cloni linfocitari (**anticorpi policlonali**) ed utilizzarli poi per studiare tessuti in cui la molecola deve essere localizzata. Questa tecnica è stata ulteriormente sviluppata con la coltura in vitro dei linfociti dell'animale immunizzato, per ottenere la selezione e l'immortalizzazione dei singoli cloni linfocitari attivati a produrre anticorpi contro diverse porzioni della molecola iniettata. In questo modo è possibile produrre in vitro una quantità illimitata di anticorpi estremamente specifici detti **anticorpi monoclonali**.

L'anticorpo si lega all'antigene, ma non è di per sé visibile al microscopio. Occorre quindi rendere visibile l'anticorpo cosicché il suo legame all'antigene possa essere evidenziato. L'anticorpo può essere modificato attraverso il legame ad esso di molecole fluorescenti di dimensioni ridotte, **fluorocromi**, che non alterano significativamente la conformazione dell'anticorpo, salvaguardando la sua capacità di legare l'antigene (Fig. 1-8). La tecnica di immunolocalizzazione che utilizza anticorpi fluorescenti è chiamata **immunofluorescenza**.

I fluorocromi sono molecole invisibili alla luce bianca di una normale lampadina, ma hanno un caratteristica: se colpiti da raggi di luce di lunghezza d'onda dello spettro non percepibile dall'occhio umano (ultravioletto, per esempio) essi divengono visibili, emettono cioè una luce percepibile dai nostri occhi. Se noi osserviamo ad un normale microscopio un preparato istologico trattato con anticorpi fluorescenti, cioè legati ad un fluorocromo, non notiamo alcunché di particolare. Ma se spegniamo la normale sorgente luminosa del microscopio e accendiamo una sorgente di luce ultravioletta (microscopio a fluorescenza), il preparato rimarrà al buio, sal-

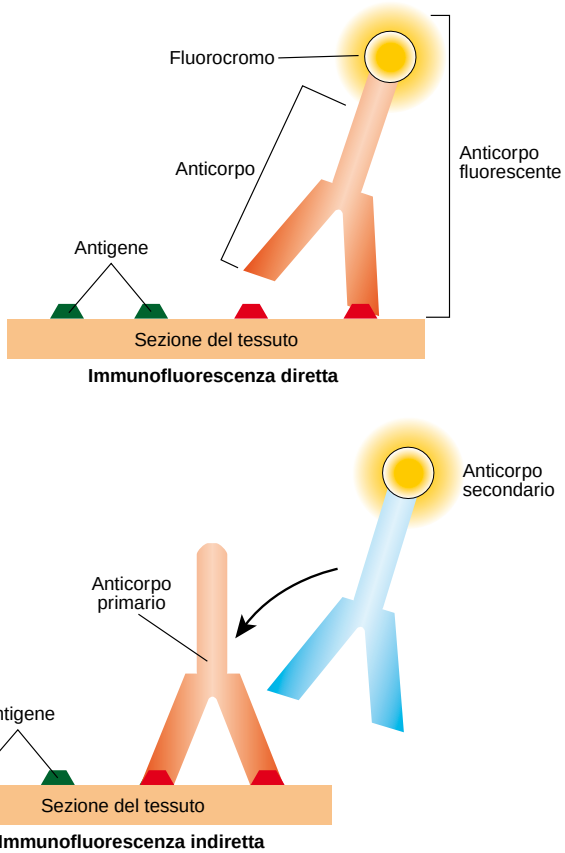



**Figura 1-8** ■ Rappresentazione schematica del legame tra antigene e anticorpo. L'anticorpo primario (in arancione nella figura) può essere direttamente legato ad un fluorocromo (anticorpo fluorescente) e si parla di fluorescenza diretta, oppure può essere legato da un anticorpo secondario (in azzurro nella figura) a cui è stato aggiunto un fluoro-cromo (fluorescenza indiretta).

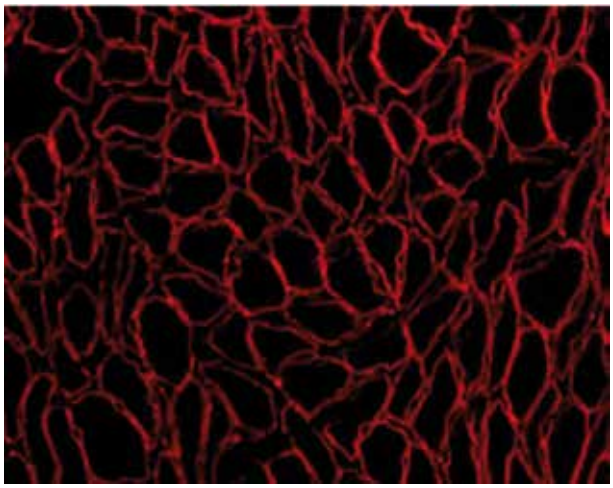


**Figura 1-9** ■ Immunofluorescenza per rivelare l'espressione e la localizzazione del sarcoglicano su sezione di fibra muscolare scheletrica.

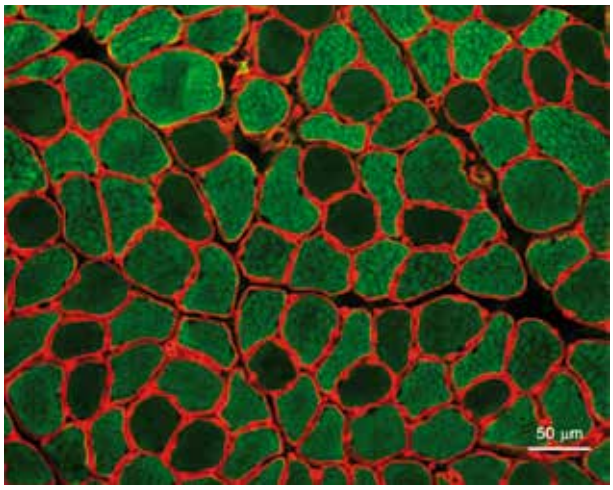



**Figura 1-10** ■ Doppia immunofluorescenza per rivelare l'espressione e la localizzazione contemporanea della laminina (rosso) e della miosina lenta (verde) su sezione di fibra muscolare scheletrica. Da notare che le fibre negative per la miosina lenta corrispondono alle fibre veloci che appaiono più scure.

vo che nei punti in cui si è legato l'anticorpo fluorescente. In questi punti osserveremo una luminosità caratteristica per il tipo di fluorocromo usato, generalmente verde, rossa o blu, che ci indicherà la presenza in quel punto della molecola che volevamo localizzare, riconosciuta appunto dall'anticorpo fluorescente (Fig. 1-9).

Studi in immunofluorescenza possono essere effettuati anche impiegando simultaneamente due diversi anticorpi o altri reagenti in grado di riconoscere due diverse molecole, per poterne analizzare i rapporti spaziali reciproci anche all'interno di una singola cellula. In questo caso, per distinguere la localizzazione delle due diverse molecole, si possono usare due fluorocromi diversi (ad esempio uno che emette fluorescenza verde e l'altro rossa) (Fig. 1-10).

Gli anticorpi possono essere resi visibili anche associando loro, in alternativa ad un fluorocromo, un enzima (in genere la perossidasi o la fosfatasi alcalina) ed utilizzando quindi come marcatore l'attività enzimatica legata all'anticorpo stesso. Questo metodo, chiamato **immunoistochimica**, associato ad opportune colorazioni (contro colorazioni) dei tessuti analizzati, consente di studiare il preparato con un normale microscopio a luce visibile e quindi disponendo dell'illuminazione di tutto il preparato anziché osservare al buio soltanto le zone fluorescenti.

## Il microscopio confocale

Un'evoluzione del microscopio ottico è rappresentata dal **microscopio confocale**, in genere usato in associazione alla fluorescenza (Fig. 1-11).

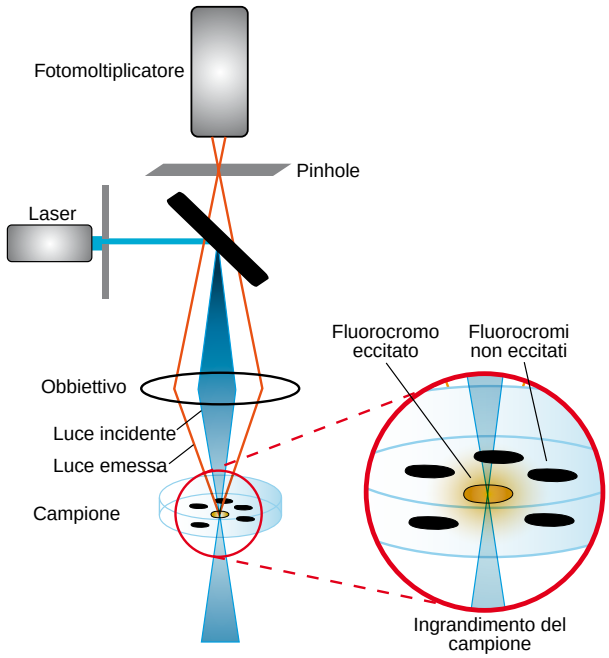



**Figura 1-11** ■ Rappresentazione schematica di come è strutturato un microscopio confocale.

La microscopia a fluorescenza classica presenta numerose limitazioni, quali fluorescenza indesiderata anche nei pressi del fuoco dell'immagine, impossibilità di effettuare una scansione in profondità dei campioni e scansioni in 3 dimensioni e limitazione del tempo di osservazione del campione.

A tal riguardo il microscopio confocale offre una più efficiente analisi morfofunzionale dei campioni biologici. In particolare la microscopia confocale permette di acquisire immagini digitali, che garantiscono l'analisi dell'architettura multidimensionale di cellule e tessuti, nonché la visualizzazione e quantificazione di organelli e molecole e lo studio della loro dinamica ed interazione anche "in vivo" e in tempo reale.

Questo strumento è in grado di mettere a fuoco piani diversi di un preparato istologico, realizzando delle sezioni sottili virtuali che consentono di osservare in successione e separatamente piani diversi di un unico preparato (Fig. 1-12).

Nei moderni microscopi confocali la luce di un laser viene fatta convergere dalle lenti dell'obbiettivo in un punto estremamente piccolo del campione osservato. Il punto stesso, attraverso un sistema di specchi oscillanti, viene spostato attraverso tutto il campo visivo dell'obbiettivo così da effettuare una scansione completa di tutto il piano focale.

Inoltre, le lenti dell'obbiettivo fanno sì che l'intensità della luce laser sia sufficiente a eccitare i fluorocromi soltanto nel punto di massima concentrazione del raggio, corrispondente al piano di messa a fuoco dell'obbiettivo. In questo modo le aree superiori ed inferiori al piano di fuoco, non venendo eccitate, non contribuiscono alla formazione dell'immagine, limitando la formazione di aloni e riducendo il "rumore di fondo" (Fig. 1-12).

## Ibridazione in situ

L'**ibridazione in situ**, come suggerisce il nome, è un metodo ideale per rivelare e localizzare specifiche sequenze di nucleotidi in sezioni di tessuto morfologicamente pre-

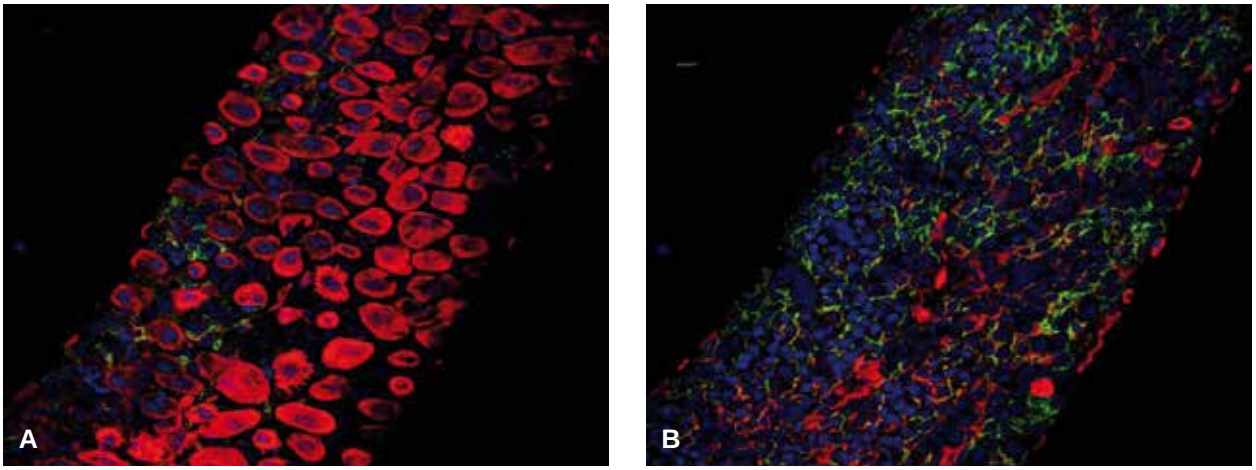



**Figura 1-12** ■ Microscopia ottica confocale di un tubulo seminifero di testicolo di ratto di 30 giorni di vita postnatale. Immunofluorescenza "Whole mount". Immagine rappresentativa di una serie spaziale composta da 20 sezioni ottiche con uno step size di 2 µm. In rosso la falloidina mette in evidenza il citoscheletro di actina; in verde anticorpi antioccludina fluorescenti mettono in evidenza le giunzioni strette presenti nella barriera ematotesticolare formata dalle cellule del Sertoli; in blu la colorazione dei nuclei. In questa immagine vengono mostrate 4 sezioni ottiche dall'esterno verso l'interno del tubulo seminifero. *A)* 0 µm: ovvero piano di fuoco iniziale dove è possibile osservare le cellule peritubulari mioidi del tubulo seminifero. *B)* 4 µm: cellule germinali mitotiche, premeiotiche e inizio della barriera ematotesticolare *in verde* tra le cellule del Sertoli. *(La figura continua a pagina seguente)*

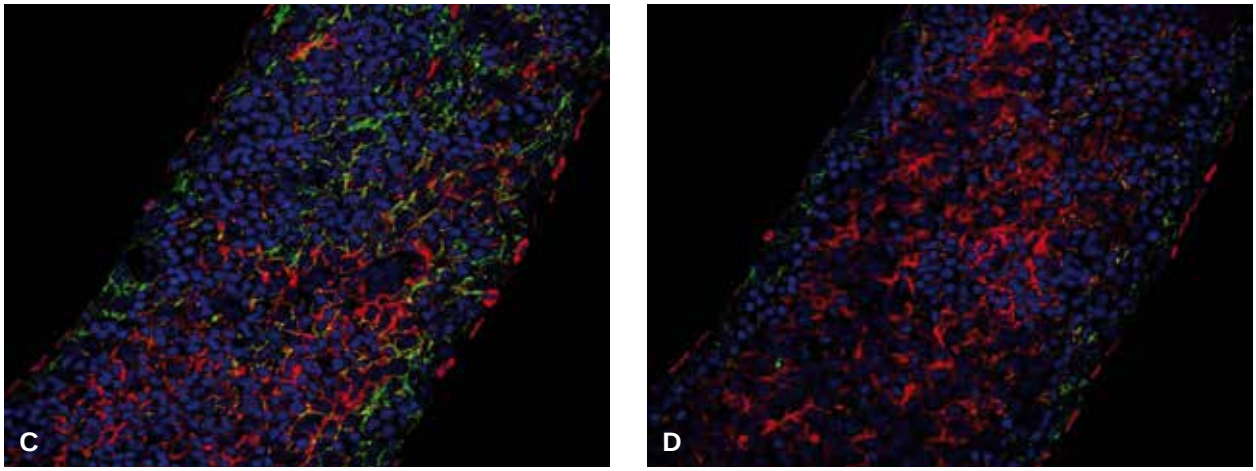



**FIGURA 1-12** *(CONTINUAZIONE)* ■ *C)* 10 µm: cellule germinali meiotiche e fine della barriera ematotesticolare tra le cellule del Sertoli. *D)* 18 µm: cellule germinali meiotiche all'interno del tubulo seminifero. (Per gentile concessione della Dott.ssa A. Catizone).

servate. Anche se questa tecnica non fornisce alcuna informazione quantitativa, essa si è rivelata molto utile per avere un'informazione posizionale molto precisa di determinati prodotti genici (Fig. 1-13), quali DNA e mRNA.

Questa tecnica può essere utilizzata in combinazione con tecniche di immunoistochimica per rivelare contemporaneamente l'espressione e la localizzazione di acidi nucleici e proteine (Fig. 1-14).

L'ibridazione in situ prevede l'impiego di sonde nucleotidiche (DNA, RNA, oligo), che sono complementari alla sequenza genica di interesse. La rilevazione del segnale è resa possibile grazie a diversi sistemi di rilevazione che permettono di marcare efficientemente le sonde. Inizialmente la tecnica si basava essenzialmente sull'utilizzo di sonde radioattive e questo ha limitato per molti anni l'utilizzo di questa tecnica anche in ambito diagnostico. Tuttavia, con l'utilizzo di sistemi di marcatura non radioattivi, come l'uso della biotina e digossigenina, queste tecniche sono state impiegate con successo anche in ambito diagnostico.

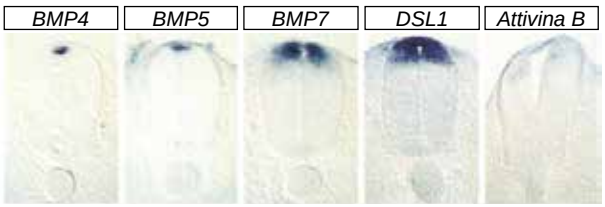



**FIGURA 1-13** ■ Riproduzione di una ibridazione in situ effettuata su sezioni di midollo spinale di embrione di pollo allo stadio 18. Utilizzando diverse sonde si rileva l'espressione e la distribuzione spaziale dei fattori BMP (bone morphogenic protein) e dell'attivina B. (Da: KF Liem, Jr., G Tremml, TM Jessell. A role for the roof plate and its resident TGFβ-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord, Cell 91, 127-138, 1997, per gentile concessione di Elsevier).

In questo contesto la **Citogenetica** ha sfruttato le caratteristiche generali dell'ibridazione in situ per sviluppare una più efficiente analisi del cariotipo, mediante l'**ibridazione in situ fluorescente** o **FISH**. La FISH è una tecnica che consente la localizzazione di una speci-

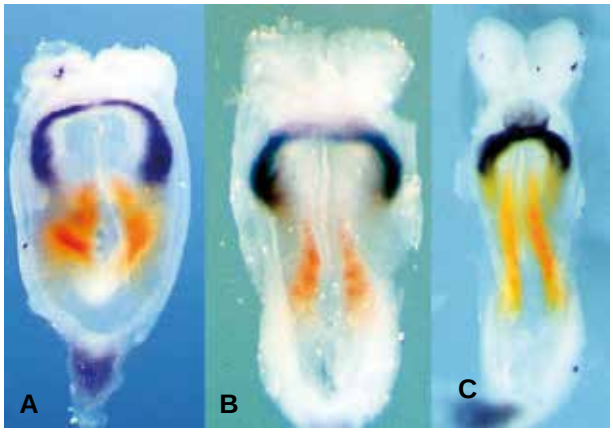



**FIGURA 1-14** ■ Doppia marcatura per ibridazione in situ. Colorazione con β-galattosidasi (viola) per TBX5 (T-box 5) (fattore trascrizionale importante per la proliferazione e il differenziamento di precursori cardiaci) e immunoistochimica (giallo-marrone) per RALDH2 (retinaldehyde dehydrogenase 2) un enzima importante per la sintesi di acido retinoico, importante morfogeno necessario per garantire la polarità antero-posteriore allo sviluppo del muscolo cardiaco) effettuata su embrioni di topo a diversi stadi di sviluppo: dallo stadio allantoideo *(A)* a quello di 6 somiti *(C)*. Si può notare come inizialmente RALDH2 è espresso esclusivamente nel mesoderma, caudalmente al nodo di Hensen *(A-B)*, mentre i precursori cardiaci si concentrano nella porzione anteriore del mesoderma. Nelle fasi più avanzate dello sviluppo *(B-C)* si nota invece come l'espressione di RALDH2 si espande anteriormente, verso il margine posteriore dell'area cardiogenica *(C)*. (Per gentile concessione del Dr. Xavier-Neto).

fica sequenza di DNA su preparati fissati di cromosomi, nuclei interfasici e sezioni di tessuto, ottenuti da qualsiasi tipo di materiale biologico, come sangue, biopsie tissutali, liquido amniotico, etc. La FISH quindi ha rappresentato un indispensabile complemento della citogenetica tradizionale, permettendo di caratterizzare anomalie cromosomiche di numero e di struttura difficili da definire attraverso le tecniche di citogenetica classica e di identificare riarrangiamenti criptici. A seconda del difetto cromosomico che interessa evidenziare risultano oggi disponibili diversi tipi di sonde. Tra le sonde che identificano sequenze ripetute, particolarmente utili risultano quelle che riconoscono sequenze centromeriche, dette alfoidi, che sono specifiche per la maggior parte dei cromosomi. Ad esempio, è possibile, mediante l'impiego di queste sonde, riconoscere la presenza di un eccesso (trisomia) o di un difetto (monosomia) di un determinato cromosoma. Altri tipi di sonda sono quelle definite painting, specifiche per un intero cromosoma, sub cromosomiche, specifiche per un intero braccio cromosomico o per regioni più o meno estese di esso, locus-specifiche, specifiche per regioni cromosomiche di piccole dimensioni.

Le principali applicazioni diagnostiche della FISH riguardano la caratterizzazione di riarrangiamenti cromosomici, la diagnosi delle sindromi da microdelezione o da micro-duplicazione, la caratterizzazione di marker cromosomici, la determinazione della percentuale di mosaicismi cromosomici, lo studio delle delezioni subtelomeriche e la valutazione della frequenza di anomalie cromosomiche nei gameti.

## IL PROGETTO GENOMA

Il **progetto genoma**, iniziato nel 1987, ha tagliato il primo traguardo nell'Aprile del 2000 quando la rivista scientifica Nature Biotechnology annuncia il completamento del sequenziamento del genoma umano da parte della Celera Genomics. Nel Febbraio 2001 viene presentata, con una serie di conferenze stampa in tutto il mondo, la mappatura completa del genoma umano: il Genoma non è quindi più un segreto.

Si tratta di una pietra miliare nella storia del genere umano. Le due riviste scientifiche internazionali più prestigiose, Nature e Science, pubblicano i risultati ottenuti rispettivamente dal gruppo di ricerca internazionale e dall'azienda privata Celera Genomics che hanno lavorato al progetto Genoma Umano.

La prima grande sorpresa è stata nel constatare che il genoma umano contiene un numero di geni molto più ridotto del previsto: non circa 100.000 come ci si aspettava, ma fra 28.000 e 40.000. Vale a dire più o meno il numero di quelli del topo, appena il triplo rispetto ai 13.000 del moscerino della frutta (*Drosophila melanogaster*), circa il doppio rispetto ai 18.000 del verme *Caenorhabditis elegans* e quasi un terzo in più di quelli della pianta *Arabidopsis thaliana*, che ne ha 26.000.

Conoscere il numero dei geni e la loro posizione vuol dire avere le coordinate per identificare i geni responsabili dei processi di sviluppo, nonché conoscere il loro coinvolgimento in molte malattie ereditarie ed intervenire per curarle. Ciò significa intervenire sistematicamente su ognuno dei geni rilevati al fine di determinare il ruolo che ciascuno di essi svolge nello sviluppo e poi utilizzare tali informazioni per identificare in modo dettagliato le caratteristiche genetiche alla base delle malattie.

Un approccio sperimentale per soddisfare queste esigenze è la generazione di specifici modelli animali.

## Modelli animali

Nell'era "post-genomica", l'uso dei modelli animali e la produzione di mutanti specifici, ha fornito una metodologia ideale per studiare in vivo l'effetto di un determinato gene.

Le nuove tecnologie della genomica funzionale si stanno rivelando molto promettenti per comprendere le basi molecolari dello sviluppo embrionale e per la costruzione di sistemi modello utili allo studio delle malattie umane.

I modelli che più si prestano a tale scopo sono gli **animali transgenici** e **knock-out**.

In questo contesto il modello murino (*mus musculus*) è considerato l'organismo modello più idoneo per studiare i meccanismi dello sviluppo embrionale e le patologie dell'uomo, con il quale il topo condivide circa il 99% dei suoi geni.

Topi e umani infatti condividono molte delle caratteristiche fisiologiche e patologiche: similitudini nei sistemi nervoso, cardiovascolare, endocrino, immunitario, muscolare e scheletrico sono stati estensivamente descritti e documentati.

Analisi comparative del genoma umano e murino hanno fornito una migliore comprensione delle caratteristiche comuni ed un'efficiente manipolazione genica nel topo, favorendo la generazione di modelli animali per patologie umane.

Per semplicità possiamo definire come animali transgenici quelli che contengono nel loro genoma uno o più geni esogeni (transgeni), introdotti nella cellula uovo fecondata. Il risultato è un topo con extra copie del transgene. Tale transgene è spesso ingegnerizzato per essere espresso in un determinato tessuto, piuttosto che in maniera ubiquitaria. Gli animali transgenici sono un ottimo modello sperimentale per studiare l'effetto di singole mutazioni geniche e quindi importanti per studiare diverse patologie dovute ad alterazione di funzione. Gli animali knock out sono invece quei modelli sperimentali in cui è stato silenziato sperimentalmente un gene e sono importanti per studiare patologie dovute ad assenza di funzione genica. Il risultato è la generazione di un topo il cui genoma non esprime il gene silenziato e conseguentemente il suo prodotto proteico.

Questa tecnica ha anche permesso di capire quali geni siano fondamentali nei primissimi stadi dello sviluppo embrionale. È infatti noto che il silenziamento di alcuni geni, oltre a determinare difetti nei processi morfogenetici, è anche incompatibile con la sopravvivenza dell'animale. In questo contesto, per verificare se un determinato gene possa essere coinvolto non solo nelle pri-

me fasi dello sviluppo embrionale, ma anche nel mantenimento dello stato differenziato di un tessuto adulto, si ricorre ad una tecnica di silenziamento genico alternativo, conosciuta come **mutagenesi condizionale** e basata sulla tecnica del *Cre-Lox* (vedi avanti). Con queste tecniche è quindi possibile esaminare la funzione di specifiche sequenze geniche e regolatorie nell'ambito dei complicati processi di sviluppo e di omeostasi tissutale. Questi studi, per esempio, hanno permesso di caratterizzare i geni coinvolti nella definizione della polarità del corpo, quale quella antero-posteriore o quella dorso-ventrale e di distinguere i geni responsabili dell'orchestrazione di processi di sviluppo quali la formazione degli organi e dei tessuti da quelli deputati al mantenimento dello stato differenziato di un tessuto.

## I topi transgenici

La costruzione di un modello animale transgenico prevede almeno cinque fasi sperimentali:

### Pianificazione dell'esperimento

In generale, il piano sperimentale prevede di verificare il ruolo di uno specifico gene in un determinato contesto biologico; per esempio studiare se tale gene è coinvolto nei processi di morte cellulare programmata, o nell'atrofia/ipertrofia muscolare, o nella sopravvivenza neuronale. In questa fase è importante la scelta del promotore che guiderà l'espressione del transgene quando integrato nel genoma dell'ospite. In pratica, per accendere un gene sono necessari interruttori molecolari, i promotori: sequenze regolatorie di DNA sulle quali si legano fattori coinvolti nella trascrizione genica, come le RNA polimerasi e i fattori di trascrizione. Queste sequenze regolatorie possono essere attivate ubiquitariamente (cioè in tutti i tessuti) oppure essere tessuto-specifiche (si attivano solo in un determinato tessuto o tipo cellulare).

Prima di essere introdotto, il transgene può essere modificato, attraverso la tecnica della mutagenesi mirata, in cui parti della sequenza codificante del gene vengono mutate sperimentalmente. Introdurre un certo numero di mutazioni mirate in un gene permette di studiare in modo rigoroso quale porzione del gene è importante e critica per la sua corretta funzione.

A volte può essere utile studiare il comportamento di regioni regolatorie, come le sequenze promotore, piuttosto che uno specifico gene. In questo caso un dato promotore, normale o mutato, può guidare l'espressione di un gene "reporter", la cui espressione non inficia la struttura e la funzione normale di un tessuto. In particolare con il termine **reporter** si intendono geni che codificano per proteine visibili, la cui espressione è facilmente quantificabile e rintracciabile. Tra questi, quelli più utilizzati sono la green fluorescent protein (GFP), la luciferasi e la β-galattosidasi. In particolare la GFP è una proteina espressa nella medusa *Aequorea victoria* ed è in grado di emettere luce di colore verde acceso se colpita da radiazione a specifica lunghezza d'onda (Fig. 1-15A).

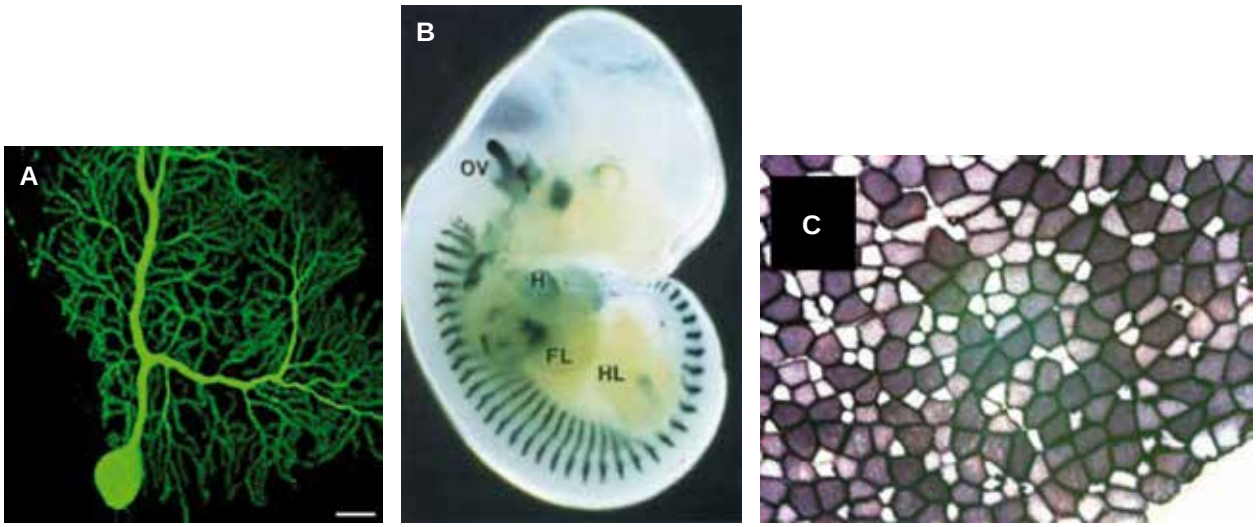



**Figura 1-15** ■ Espressione di geni reporter sotto il controllo di promotori tessuto specifici. *A)* Espressione della GFP in una cellula del Purkinje. L'espressione della GFP è sotto il controllo trascrizionale del promotore neuronale GAD67 (Da: F. Ango e coll. Bergmann glia and the recognition molecule CHL1 organize GABAergic axons and direct innervation of Purkinje cell dendrites, PLoS Biology, 6, 4, e103, 2008, doi:10.1371/journal.pbio. 0060103). *B)* Colorazione con X-Gal di un embrione di topo di 11,5 giorni di sviluppo. Il gene reporter β-galattosidasi è sotto il controllo trascrizionale di un promotore muscolo specifico (MLC3f) che si attiva a livello dei somiti, degli abbozzi degli arti e del cuore (Da: R. Kelly e coll. Myosin light chain 3F regulatory sequences confer regionalized cardiac and skeletal muscle expression in transgenic mice, The Journal of Cell Biology, 129, 2, 383-396, 1995, per gentile concessione di The Rockefeller University Press). *C)* Sezione trasversale di muscolo scheletrico. L'espressione del gene reporter della fosfatasi alcalina umana è sotto il controllo trascrizionale del promotore MLC1 che si attiva selettivamente nelle fibre muscolari veloci (per gentile concessione della Dr.ssa L. Rosenthal).

L'utilizzo di questa proteina ha migliorato radicalmente alcuni campi della ricerca biomedica, consentendo di monitorare in tempo reale l'attività della proteina e l'espressione dei geni all'interno di una cellula vivente. La scoperta e le applicazioni della GFP hanno valso il premio Nobel per la chimica del 2008 a Osamo Shimomura, Martin Chalfie e Roger Tsien. La luciferasi è un enzima in grado di catalizzare la produzione di luce a partire dall'ossidazione della proteina luciferina in presenza di ATP e $O_2$. La β-galattosidasi (β-Gal) è un enzima codificato dal gene batterico LacZ che, in presenza di un substrato chiamato X-Gal, colora le cellule che la esprimono di blu (Fig. 1-15B). Un altro gene reporter utilizzato è quello che codifica per la fosfatasi alcalina. Le fosfatasi alcaline sono enzimi che partecipano al metabolismo dei composti fosforici organici, agiscono in condizioni di pH alcalino e si possono evidenziare mediante una semplice colorazione enzimatica (Fig. 1-15C).

### Clonare/sub-clonare e verificare l'integrità del transgene

Clonare significa inserire il gene di interesse in un vettore, solitamente un plasmide, ovvero una molecola di DNA circolare a doppia elica capace di replicazione autonoma quando inserita all'interno di un ospite batterico. Di fondamentale importanza in questa fase è che il "costrutto" molecolare (plasmide + transgene) contenga marcatori unici in modo tale che la sua presenza sia facilmente rilevabile in campioni di DNA, e di conseguenza la sua espressione possa essere facilmente analizzata e distinta dal gene endogeno. Tappe fondamentali in questa fase di clonaggio sono l'inserzione stabile del frammento genico nel plasmide, il trasferimento del costrutto molecolare in cellule batteriche, l'isolamento dei cloni positivi contenenti il costrutto molecolare e l'estrazione del DNA plasmidico dai batteri (Fig. 1-16A).

### Microiniezione del costrutto molecolare nella cellula uovo fecondata (zigote)

Una volta ottenuto, amplificato e purificato il "costrutto" molecolare, esso deve poi essere inserito nella cellula uovo fecondata mediante la tecnica della microiniezione, una metodologia che permette l'introduzione di macromolecole e frammenti genici in cellule viventi. Più precisamente, si depositano con una microsiringa 1-2 picolitri di DNA che contengono circa 100-200 copie del gene da inserire. La cellula uovo fecondata è caratterizzata da due nuclei chiamati **pronucleo maschile** e **femminile**. Solitamente il transgene viene micro-iniettato nel pronucleo maschile in quanto più grande di quello femminile.

La cellula uovo micro-iniettata viene inserita nell'utero di una femmina pseudogravida (adottiva) che genererà un topo **chimera** (mosaico di cellule con patrimoni genetici diversi) (Fig. 1-16B). Nella fase successiva si effettua un incrocio riproduttivo tra il topo chimera e un topo normale con la nascita di topi "transgenici", i quali saranno analizzati per la presenza del transgene.

### Stabilire un metodo di screening

Questa fase è importante per stabilire il numero di copie del transgene, la sua integrazione e l'integrità del transgene nei topi "fondatori" prima che essi vengano accoppiati per l'espansione del modello transgenico. A questo scopo si utilizzano prevalentemente tecniche di biologia molecolare, in grado di rivelare la presenza di specifici RNA messaggeri (Northern blot, RT-PCR) e sequenza di DNA (Southern blot).

### Stabilire un saggio di espressione

Una volta ottenuti gli animali transgenici è importante verificare l'espressione del transgene in un dato tessuto. A tale scopo, possono essere utilizzate varie tecniche come l'ibridazione *in situ*, il Northern blot e l'RT-PCR.

I topi transgenici permettono quindi di verificare quanto l'espressione di un gene sia fondamentale per un determinato processo biologico, oppure per seguire il destino differenziativo di una **cellula staminale**.

Come verrà discusso in particolare nel Capitolo 4, le cellule staminali sono popolazioni cellulari coinvolte nei meccanismi di rigenerazione, riparazione e omeostasi tissutale. Caratteristiche peculiari delle cellule staminali sono la clonogenicità, cioè la capacità di autoreplicarsi in modo pressoché indefinito, e la divisione asimmetrica, per cui una cellula figlia mantiene le potenzialità staminali perpetuando se stessa e partecipando al meccanismo di automantenimento (self renewal), mentre l'altra cellula figlia intraprende un destino differenziativo partecipando al riparo di un tessuto danneggiato.

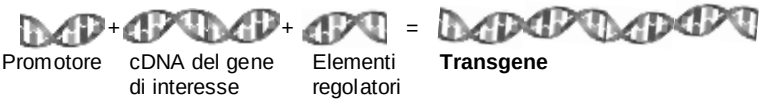
Una terza caratteristica tipica di molte cellule staminali è la "plasticità differenziativa". In particolar modo è stato osservato che quando una cellula staminale è prelevata dalla sua nicchia biologica e costretta a risiedere in un'altra regione del corpo, essa può intraprendere destini differenziativi completamente nuovi ed inaspettati. Queste osservazioni sono state ottenute utilizzando modelli animali transgenici.

Ad esempio è stato dimostrato che cellule staminali del midollo osseo, che normalmente producono cellule del sangue, possono contribuire alla rigenerazione di un muscolo scheletrico danneggiato. È noto che il compartimento staminale classico del muscolo scheletrico è rappresentato dalla cellule satelliti, cellule quiescenti localizzate tra la lamina basale e il sarcolemma della fibra muscolare. Tuttavia, anche se le cellule satelliti svolgono il compito principale, altre popolazioni cellulari possono contribuire alla riparazione di un danno muscolare.

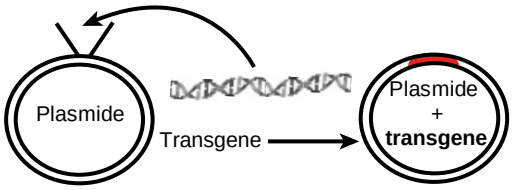
Uno degli esperimenti pionieristici che ha evidenziato la migrazione di cellule staminali dal midollo osseo verso il compartimento muscolare danneggiato e il loro successivo differenziamento muscolare ha comportato l'utilizzo del topo transgenico MLC3f/LacZ, in cui il gene reporter *LacZ-β-Gal* era posto sotto il controllo trascrizionale di un promotore muscolo-specifico, quello della catena leggera della miosina (MLC), per cui solo le fibre muscolari sarebbero state in grado di attivare l'espressione del gene reporter. Cellule staminali ematopoietiche sono state prima isolate dal midollo osseo di que-

A

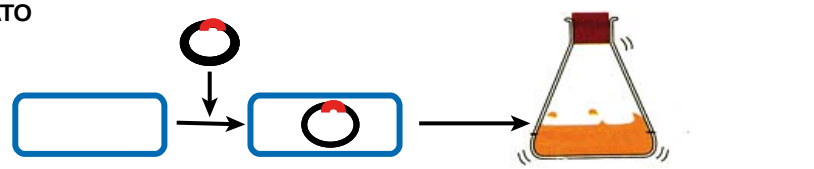
**1) COSTRUZIONE DEL TRANSGENE**




**2) INSERIMENTO DEL TRANSGENE IN UN PLASMIDE**



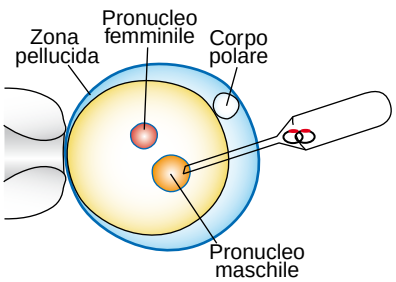

**3) IL DNA PLASMIDICO RICOMBINANTE VIENE INTRODOTTO IN UNA CELLULA BATTERICA E REPLICATO**



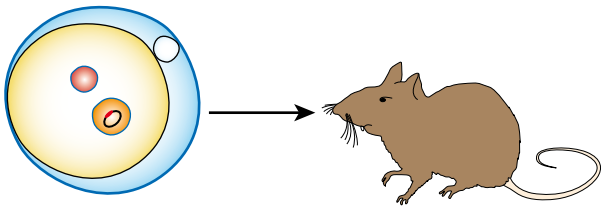

**4) ISOLAMENTO, DAI BATTERI LISATI, DI MOLTE COPIE DI PLASMIDE RICOMBINANTE PURO**

B

**5) MICROINIEZIONE DEL COSTRUTTO NELLA CELLULA UOVO FECONDATA**




**6) IMPIANTO DEGLI EMBRIONI MICROINIETTATI IN FEMMINE PSEUDOGRAVIDE**



**7) SELEZIONE DEI TOPI "TRASGENICI"**

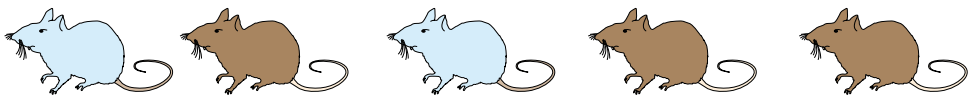



**FIGURA 1-16** ■ *A)* Rappresentazione schematica dei vari passaggi necessari alla costruzione di un vettore transgenico. *B)* Rappresentazione schematica dei vari passaggi necessari alla generazione di un topo transgenico.

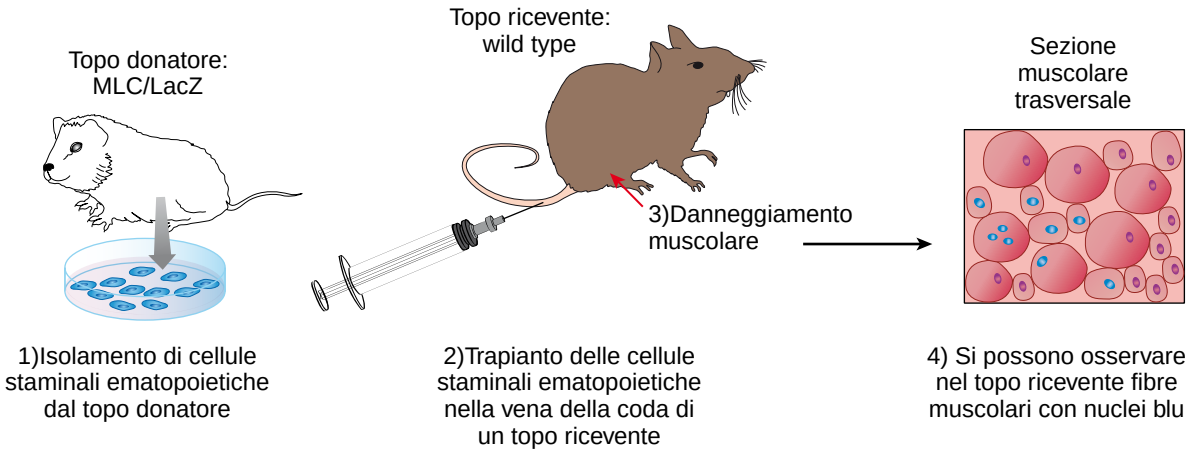



**Figura 1-17** ■ Rappresentazione schematica dell'esperimento di trapianto di cellule staminali ematopoietiche isolate dal topo transgenico MLC3f/LacZ e trapiantate per via sistemica in un topo ricevente normale (wild type). In seguito ad un danneggiamento muscolare, le cellule staminali ematopoietiche trapiantate raggiungono il muscolo scheletrico danneggiato e partecipano alla rigenerazione muscolare, come si evidenzia dalla presenza di nuclei blu nelle fibre muscolari del topo ricevente che attestano l'attivazione del promotore muscolo-specifico MLC e quindi l'espressione del gene reporter *LacZ-βGal*.

sto topo transgenico MLC3f/LacZ e poi trapiantate per via sistemica in un topo normale (wild type) (Fig. 1-17). Subito dopo il trapianto, il muscolo è stato danneggiato mediante iniezione di cardiotossina, una sostanza che provoca una locale necrosi delle miofibre stimolando la rigenerazione muscolare. Si è dimostrato che le cellule staminali ematopoietiche trapiantate erano in grado di circolare, di raggiungere il compartimento muscolare danneggiato e partecipare alla rigenerazione muscolare, come evidenziato dalla presenza di fibre muscolari con nuclei blu-βGal positivi (Fig. 1-17), derivanti dalle cellule staminali ematopoietiche trapiantate. Questo significa che cellule staminali ematopoietiche abbandonando il loro microambiente classico (quello del midollo osseo) ed entrando nella nicchia muscolare ricevono segnali "miogenici" che inducono l'attivazione del promotore muscolo-specifico MLC e quindi l'espressione del gene reporter *LacZ-βGal* e il loro transdifferenziamento in cellule muscolari.

## Il topo knock out e knock in

La tecnica per la generazione di un topo **knock out** e/o **knock in** è sostanzialmente diversa da quella per la generazione di un animale transgenico e si basa sulla **ricombinazione omologa**, processo attraverso cui si realizzano scambi di materiale genetico fra due molecole di DNA, o segmenti della stessa molecola, che possiedono un'ampia regione di sequenze omologhe (Fig. 1-18).

La ricombinazione omologa garantisce che il DNA esogeno venga inserito nel genoma della cellula ospite in uno specifico locus.

Tale processo è un meccanismo utile ad aumentare la variabilità genetica all'interno di una popolazione. Il principale contributo alla variabilità genetica viene dato dalla meiosi, un processo cui vanno incontro le cellule germinali maschili e femminili prima di diventare gameti (vedi Capitolo 5).

Un contributo notevole allo sviluppo dei modelli sperimentali knock out e knock in è stato dato dai tre premi Nobel per la medicina nel 2007: Mario R. Capecchi, Martin J. Evans, e Oliver Smithies i quali hanno avuto l'intuizione che la ricombinazione omologa potesse essere utilizzata per modificare in modo specifico singoli geni nelle cellule di mammifero.

La differenza sostanziale tra topo knock out e topo knock in si basa sul fatto che nel topo knock out si ha il completo silenziamento di un gene nel suo specifico locus; nel topo knock in invece si inserisce il gene mutato, quindi alterato ma non silente, nel suo specifico locus.

Di fondamentale importanza nella costruzione di una sequenza genica mutata è l'inserimento di una sequenza di "selezione" che permetta di selezionare le cellule "mutate". A tale scopo il gene di selezione più comunemente usato è quello che codifica per la resistenza ad un antibiotico: la neomicina (Fig. 1-18). Una volta ottenuta la sequenza genica mutata (costrutto) si passa al suo trasferimento in cellule staminali embrionali (cellule ES) ottenute da una blastocisti (Fig. 1-19). L'inserimento del costrutto nelle cellule ES avviene mediante una tecnica chiamata elettroporazione. L'elettroporazione consiste in una repentina scarica elettrica la quale provoca l'apertura di piccoli pori sulla membrana cellulare, permettendo l'ingresso del DNA. Quest'ultimo, con una probabilità di successo variabile a seconda della lunghezza e disposizione delle sequenze omologhe nel costrutto, grado di omologia tra le sequenze contenute nel vettore ed il gene target, nonché la localizzazione cromosomica del gene target, sostituisce il frammento genico endogeno mediante ricombinazione omologa.

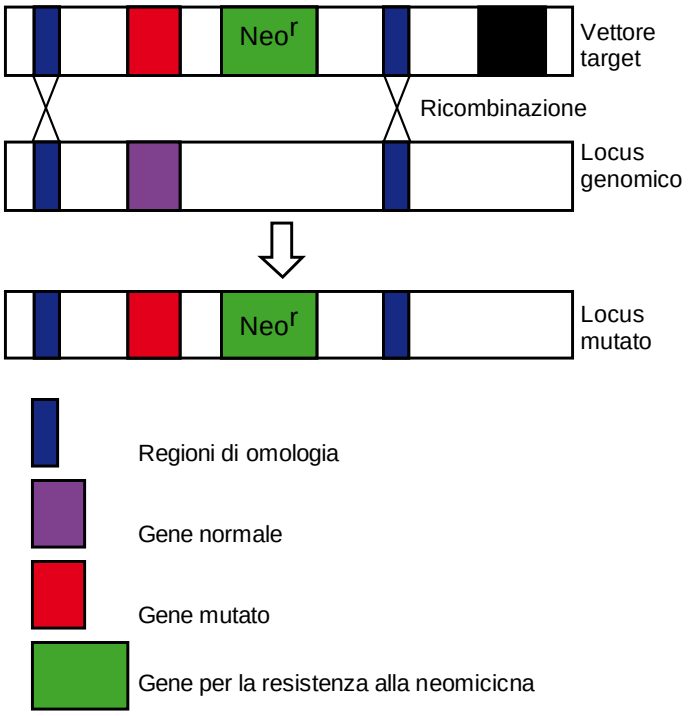



**Figura 1-18** ■ Schema di ricombinazione omologa tra un locus genomico e il vettore target ingegnerizzato.

Lo stadio successivo è la selezione delle cellule ES "geneticamente mutate" in cui cioè è avvenuta la ricombinazione omologa. Questo è possibile grazie all'espressione del gene "selezione": il gene per la resistenza alla neomicina che conferisce la resistenza alle cellule che lo esprimono, mentre tutte le altre cellule, che non hanno integrato il costrutto, saranno sensibili all'antibiotico e quindi moriranno.

Le cellule resistenti verranno quindi micro-iniettate in una blastocisti "ospite" e la nuova blastocisti impiantata nell'utero di una topolina pseudogravida che porterà avanti la gravidanza (Fig. 1-16).

Un fatto importante da sottolineare è che le cellule staminali embrionali utilizzate per l'inserimento del costrutto derivano da un animale con un colore del manto diverso da quello delle cellule della blastocisti che le ospitano. Gli animali che nascono da queste blastocisti possiedono tessuti formati n parte da cellule della blastocisti e in parte da cellule derivanti dalle cellule staminali modificate geneticamente, e quindi facilmente riconoscibili dal colore ibrido del manto (Fig. 1-19). Tali animali vengono propriamente definiti **chimere**. I topi chimera vengono poi fatti incrociare con dei topi wild type (normali) per ottenere la linea eterozigote e da questa i topi omozigoti, in cui i due alleli del gene risultano mutati.

Nei successivi capitoli verranno presentati diversi modelli sperimentali di topi knock out, in cui il silenziamento di uno o più geni è associato ad alterazioni nei processi di sviluppo embrionale. Un esempio paradigmatico di come questo approccio tecnologico abbia contribuito in modo significativo a chiarire i meccanismi morfogenetici è dato dal tessuto muscolare.

Come verrà discusso dettagliatamente nei Capitoli 4 e 18, nei vertebrati, ad eccezione di alcuni muscoli craniofacciali, l'intera muscolatura scheletrica origina dai somiti, strutture epitelioidi derivate dalla segmentazione del mesoderma parassiale posto lungo ciascun lato del tubo neurale e della notocorda. Man mano che il somite matura si differenziano tre regioni deputate alla formazione di determinati tipi cellulari: sclerotomo, dermatomo e miotomo (Fig. 1-20). Nella porzione ventro-mediale del somite, lo sclerotomo, le cellule acquisiscono un fenotipo mesenchimale e da questa struttura deriveranno vertebre, coste e dischi intervertebrali. La porzione più dorsale comprende il dermamiotomo che all'inizio è una struttura unica, poi si separa in due porzioni, il dermatomo (più dorsale) e il miotomo. Il dermatomo darà origine a parte del derma, mentre dal miotomo origineranno i muscoli epi-assiali (muscoli della schiena) e ipo-assiali (muscoli degli arti e della parete corporea).

Un ruolo chiave nello sviluppo muscolare viene svolto da quattro fattori di trascrizione miogenica (MRFs, myogenic regulatory factors): MYF-5 (myogenic factor 5), MyoD (myogenic differentiation), miogenina e MRF4 (myogenic regulatory factor 4). Questi vengono anche detti "master genes" in quanto sono in grado di orchestrare un intero programma di espressione genica mu-

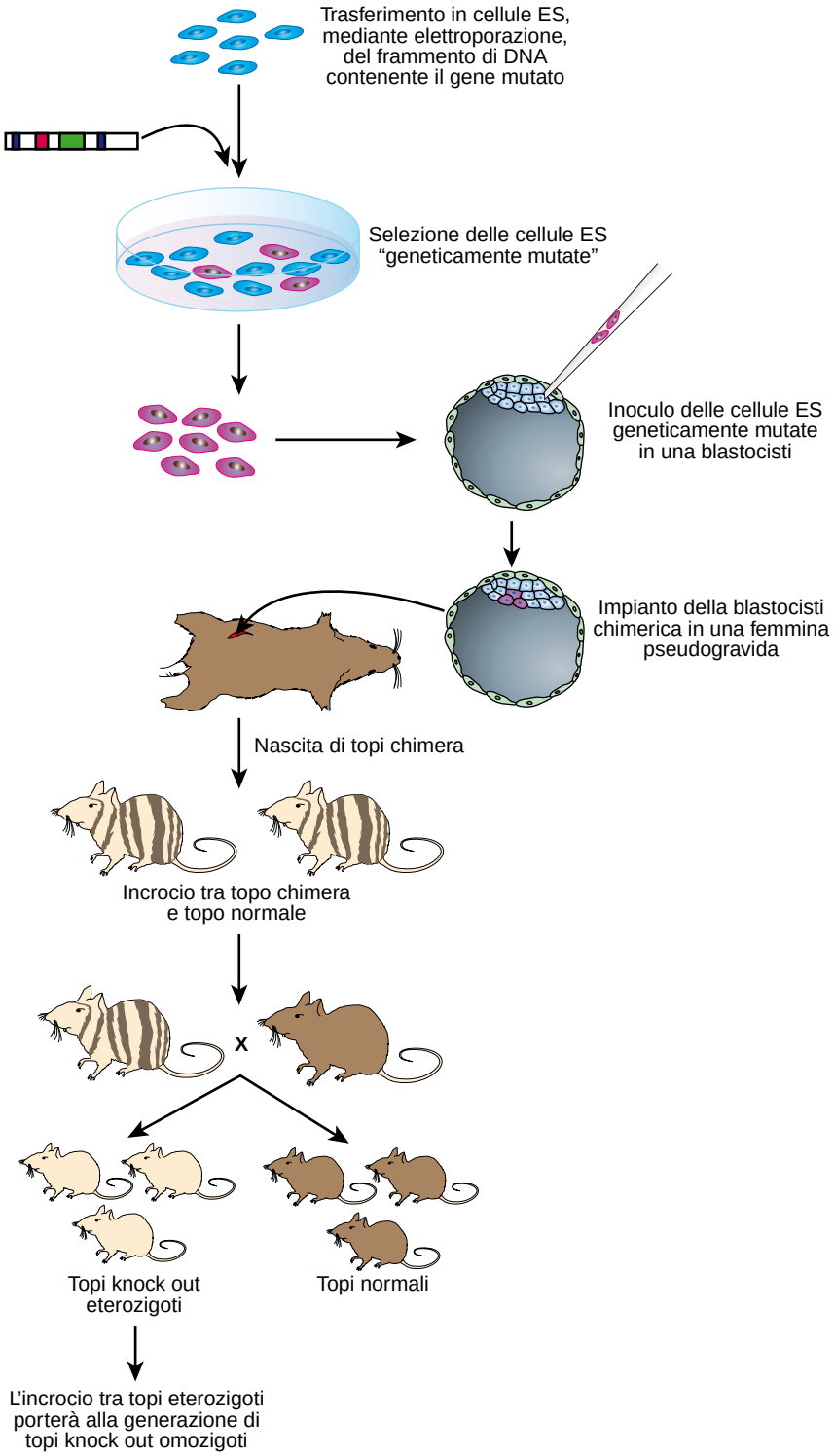



**Figura 1-19** ■ Rappresentazione schematica dei vari passaggi necessari alla generazione di un topo knock out.

scolo-specifica quando espressi forzatamente in cellule non-muscolari, come ad esempio in cellule del connettivo. In altre parole, quando gli MRFs vengono espressi in cellule in cui normalmente sono silenti, come ad esempio i fibroblasti, possono convertire tali popolazioni cellulari in cellule muscolari.

Esperimenti di ibridazione in situ hanno evidenziato la loro espressione spazio-temporale nel corso dello svi-

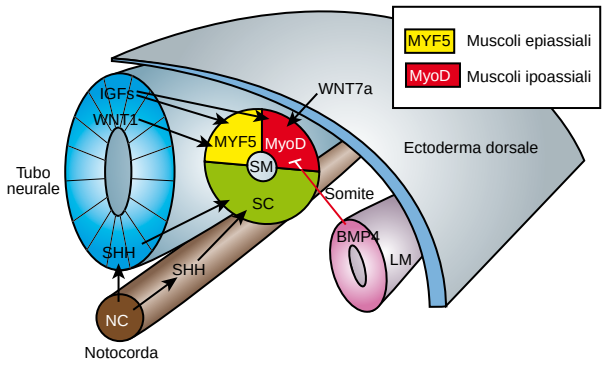



**Figura 1-20** ■ Rappresentazione schematica dello sviluppo muscolare. I muscoli scheletrici derivano dai somiti che ricevono segnali dai tessuti circostanti, quali tubo neurale, notocorda, ectoderma dorsale e mesoderma laterale. Segnali dal tubo neurale attivano la miogenesi attraverso l'induzione dell'espressione del gene Myf-5, la cui proteina codificata promuove lo sviluppo dei muscoli epiassiali; mentre i segnali provenienti dall'ectoderma dorsale attivano MyoD e inducono lo sviluppo della muscolatura ipoassiale. MYF-5 e MyoD sono proteine con ruolo di fattori di trascrizione miogenica in grado di orchestrare un intero programma di espressione genica muscolo-specifico (vedi anche Capitolo 11).

luppo embrionale, mentre esperimenti di knock out genico hanno dimostrato il loro specifico ruolo nelle diverse fasi dello sviluppo muscolare. Si è dimostrato in tal modo che il silenziamento dei geni *MyoD* o di *Myf-5* non altera in modo significativo lo sviluppo muscolare, suggerendo che questi due fattori non sono importanti nelle fasi iniziali della miogenesi (sviluppo muscolare). In realtà si è visto che il silenziamento di *MyoD* comporta nel topo knock out chiamato $MyoD^{-/-}$ un aumento dell'espressione di *Myf-5* che funzionerebbe da fattore di compensazione e quindi garantirebbe da solo, anche in assenza di *MyoD*, il corretto sviluppo della muscolatura scheletrica. Per avvalorare questa ipotesi sono stati generati dei doppi mutanti, $Myf\text{-}5^{-/-} \times MyoD^{-/-}$, e si è osservato che il silenziamento di entrambi i geni comporta un'alterazione dello sviluppo della muscolatura dai somiti e quindi la completa assenza di tessuto muscolare scheletrico. Il knock out di miogenina invece mostrava una alterazione nella massa muscolare con la presenza di cellule mononucleate indifferenziate a rimpiazzare le fibre muscolari mature. Questo ha suggerito che l'assenza di miogenina non compromette la formazione di mioblasti, le cellule indifferenziate del muscolo scheletrico, ma compromette il loro differenziamento in cellule più mature. Per cui si è stabilito che MyoD e MYF-5 sono coinvolti nelle fasi iniziali dello sviluppo muscolare (fase della determinazione miogenica), mentre miogenina è importante per una fase più avanzata (differenziamento) dello sviluppo muscolare.

Un altro esempio è offerto dal cosiddetto "topo nudo", caratterizzato da aplasia del timo e assenza di pelo (Fig. 1-21).

La base genetica del topo nudo è una ablazione del gene *FoxN1* (forkhead boxN1) che codifica per un fattore trascrizionale importante nello sviluppo del timo. L'espressione di *FoxN1* correla con lo stato di specializzazione delle cellule epiteliali timiche ed è necessario per il reclutamento dei precursori dei linfociti e per l'ulteriore specializzazione delle cellule epiteliali timiche corticali e midollari. L'alterazione quindi del gene *FoxN1* sia nel topo che nell'uomo risulta in una severa immunodeficienza causata da un intrinseco difetto nello sviluppo delle cellule del timo, associata ad una alopecia congenita. In particolare, l'assenza di timo causa una deficienza del sistema immunitario che si compone quasi interamente di linfociti B e Natural Killer, con riduzione quantitativa e funzionale della popolazione di linfociti T.

L'inabilità al rigetto di tessuto neoplastico allogenico o xenogenico rende il topo nudo un modello in vivo per lo studio di tumori umani.

Altri modelli di topi knock out hanno permesso di capire il ruolo specifico di geni non solo nelle fasi di sviluppo embrionale, ma anche nella patogenesi di molte malattie.

**Figura 1-21** ■ Immagine di un topo nudo in cui l'ablazione del gene *FoxN1* risulta in una severa immunodeficienza causata ad un difetto nello sviluppo del timo, associata ad una alopecia congenita.

## Mutagenesi condizionale: il sistema *Cre-Lox*

Questa strategia risulta estremamente vantaggiosa quando sono coinvolti geni la cui mutazione risulterebbe letale. Il sistema *Cre-Lox* viene utilizzato per produrre modelli knockout condizionali in cui è possibile accendere o spegnere l'espressione di un gene "bersaglio" in un determinato tipo cellulare ed in un particolare stadio di sviluppo o vita post-natale.

Come funziona il sistema *Cre-Lox*? CRE è una ricombinasi sito-specifica che riconosce la sequenza LoxP del batteriofago P1.

Quando due siti loxP vengono inseriti nel DNA, la proteina cre promuove la rimozione del frammento di DNA compreso tra i loxP. Incrociando un topo che porta il gene bersaglio, fiancheggiato da due sequenze LoxP, con uno in cui il gene *Cre* si trova sotto il controllo di un promotore tessuto-specifico, si ottiene un organismo in cui il gene verrà rimosso solo nelle cellule che esprimono *Cre* (Fig. 1-22).

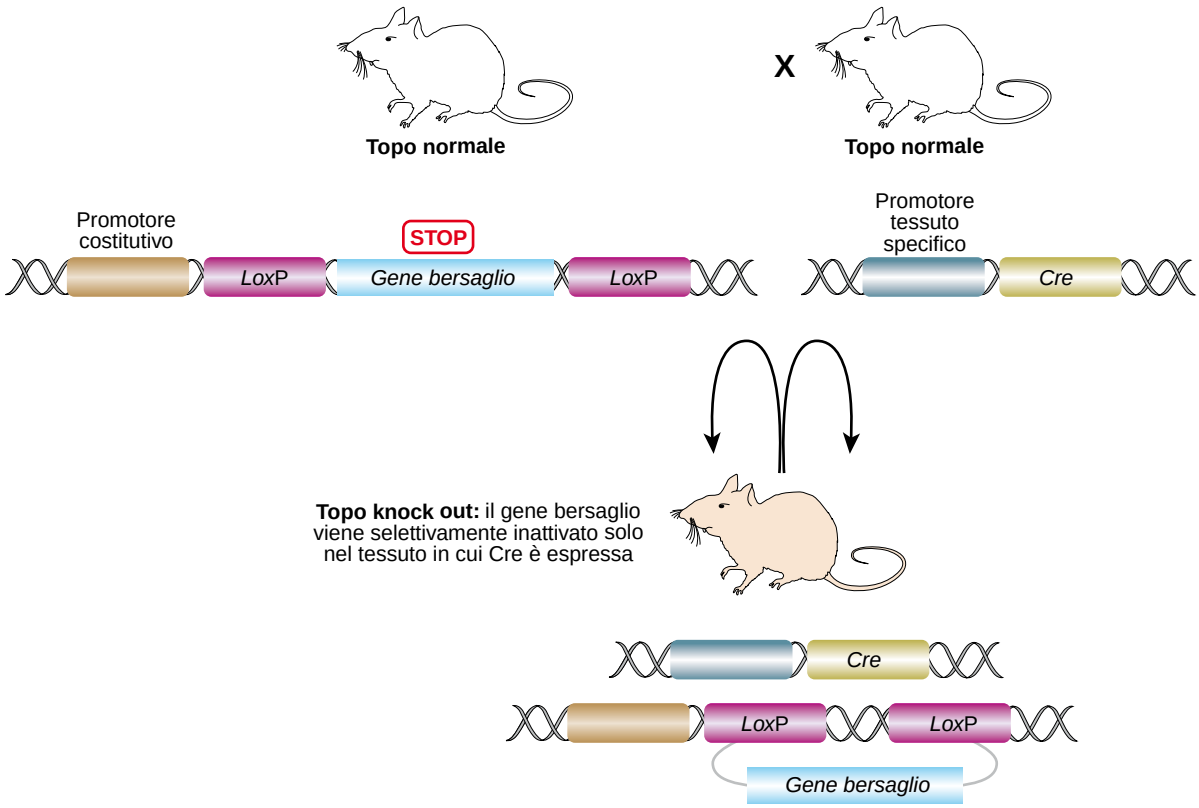



**Figura 1-22** ■ Rappresentazione schematica del sistema *Cre-Lox* e generazione del topo knock out condizionale.

## Bibliografia citata nel testo e letture consigliate

Borenstein JT, Weinberg EJ, Orrick BK, Sundback C, Kaazempur-Mofrad MR, Vacanti JP. Microfabrication of three-dimensional engineered scaffolds. Tissue Eng 13(8), 1837-44, 2007.

Burton NM, Vierck J, Krabbenhoft L, Bryne K, Dodson MV. Methods for animal satellite cell culture under a variety of conditions. Methods Cell Sci 22(1), 51-61, 2000.

De Felici M, Siracusa G. The rise of embryology in Italy: from the Renaissance to the early 20th century. Int J Dev Biol 44, 515-521, 2000.

Dulbecco R. La mappa della vita. Sperling & Kupfer, 2005.

Engelmayr GC Jr, Cheng M, Bettinger CJ, Borenstein JT, Langer R, Freed LE. Accordion-like honeycombs for tissue engineering of cardiac anisotropy. Nat Mater 7(12), 1003-1110, 2008.

Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. Science Mar 6, 279(5356), 1528-1530, 1998.

Gulisano M, Boncinelli E. Biologia molecolare. Ibridazione in situ. Accademia Nazionale di Medicina, 1995.

Hopwood N. A history of normal plates, tables and stages in vertebrate embryology. Int J Dev Biol 51, 1-26, 2007.

Ikada Y. Tissue engineering: fundamentals and applications, Academic Press, 2006.

Marchisio PC, Tacchetti C. Immunofluorescenza per colture cellulari. Accademia Nazionale di Medicina, 1993.

Mariottini GL, Capicchioni V. Introduzione alle colture cellulari metodiche relative. Tecniche Nuove Editore, 03, 2006.

Musarò A. Le cellule staminali: dal mito di Prometeo alla medicina rigenerativa. In: Biotecnologie e progresso della Medicina, University Press Mondadori Università, Sapienza Università di Roma 2009.

Musarò A, Barberi L. Isolation and culture of mouse satellite cells. Methods Mol Biol. 633, 101-11, 2010.

Rosenthal N, Brown S. The mouse ascending: perspectives for human-disease models. Nat Cell Biol 9(9), 993-999, 2007.

Ryding AD, Sharp MG, Mullins JJ. Conditional transgenic technologies. J Endocrinol 171(1), 1-14, 2001.

van der Weyden L, Adams DJ, Bradley A. Tools for targeted manipulation of the mouse genome. Physiol Genomics Dec 3, 11(3), 133-64, 2002.

Zimmermann WH, Eschenhagen T. Embryonic stem cells for cardiac muscle engineering. Trends Cardiovasc Med 17(4), 134-140, 2007.

2

# Principi e meccanismi molecolari dello sviluppo embrionale

Massimo De Felici e Antonio Filippini

Lo studio dei meccanismi molecolari che controllano lo sviluppo embrionale in generale e in particolare nei mammiferi a sviluppo embrionale interno, presenta notevoli difficoltà sia per la complessità e diversità delle strutture che si vanno a formare sia per i problemi delle sperimentazioni sull'embrione. Per questo motivo molti studi oggi, come in passato, vengono condotti su embrioni di animali che hanno una semplice organizzazione corporea e/o uno sviluppo embrionale esterno. Non deve sorprendere quindi se spesso in questo testo si farà riferimento a studi condotti nel verme C. elegans, nel moscerino della frutta (Drosophila), nel pollo o nel rospo (Xenopus), che rappresentano dei modelli di sviluppo embrionale più semplici e di più facile approccio sperimentale rispetto a quello umano, ma che forniscono informazioni estremamente utili per comprendere lo sviluppo dell'embrione umano. Anche lo sviluppo embrionale del topo è stato ed è oggetto di numerose ricerche sia perché, come mammifero, si ritiene che rappresenti un modello di sviluppo embrionale più vicino a quello umano, sia per la disponibilità sempre maggiore di topi transgenici. Utilizzando animali transgenici, come spiegato nel Capitolo 1, gli scienziati possono oggi inattivare o esprimere in maniera controllata specifici geni in determinati periodi di sviluppo embrionale e in specifiche popolazioni cellulari. Si capirà più avanti come questo sia fondamentale per scoprire quali siano i geni e i meccanismi molecolari che controllano lo sviluppo di un embrione.

## LE PRIME FASI DELLO SVILUPPO EMBRIONALE

Studiando lo sviluppo embrionale in modo comparato, gli scienziati hanno scoperto che pur nella diversa complessità delle strutture e dei meccanismi molecolari che presiedono alla loro formazione, i principi e i meccanismi molecolari di base che guidano lo sviluppo di un embrione sono sorprendentemente simili tra le diverse specie animali.

Lo sviluppo embrionale infatti è guidato da complesse interazioni molecolari che seguono una logica e una precisa sequenza temporale affermatesi probabilmente durante l'evoluzione degli organismi viventi per assicurare la conservazione della specie. Esaminando le prime fasi dello sviluppo embrionale nei mammiferi, possiamo individuare tre principali processi che in generale guidano lo sviluppo dell'uovo fecondato:

- una rapida serie di **divisioni cellulari** che servono a formare un primo gruppo di cellule del nuovo organismo;
- la **riprogrammazione del genoma** di queste cellule che fa sì che i geni necessari allo sviluppo di tutti i tessuti del nuovo organismo possano essere disponibili all'attivazione;
- la ricerca di una **fonte di energia** sufficiente ad alimentare il numero crescente di cellule dell'embrione.

Inizialmente questi processi avvengono nell'embrione utilizzando proteine e RNA accumulati nell'ovocito durante l'ovogenesi e solo successivamente passano sotto il controllo del genoma proprio dell'embrione (nell'uomo tra lo stadio di 4 e 8 cellule). Inoltre, essi avvengono in larga misura a seguito di processi molecolari intrinseci alle cellule embrionali attivati alla fecondazione o ad interazioni ravvicinate tra esse. Durante questi processi l'embrione chiamato **morula**, è formato da un piccolo gruppo di cellule o **blastomeri** equivalenti e con un genoma estremamente plastico, ovvero con molti geni accessibili alla trascrizione. Questa plasticità genomica, dovuta al particolare stato del genoma dell'ovocito e ai processi di riprogrammazione del DNA che si verificano negli stessi blastomeri, è chiamata **totipotenza** ed è necessaria affinché essi possano dare origine a tutte le cellule del nuovo organismo mediante i processi differenziativi che presto cominceranno a verificarsi.

Appena giunto a contatto con i tessuti dell'utero materno (endometrio), l'embrione deve aderirvi e attraversarli per raggiungere rapidamente i vasi sanguigni ed avere quindi accesso ai nutrienti del sangue della madre. Per questo il primo tessuto che differenzia alla superficie

della morula è il **trofoblasto** specializzato nell'adesione e invasione dei tessuti materni, ma anche nel trasporto di molecole. Le cellule al centro della morula rimangono indifferenziate e pluripotenti (in grado di dare origine a tutti i tessuti dell'embrione, ma non più al trofoblasto), e sono ora chiamate cellule della **massa cellulare interna** (**ICM**). A seguito del trasporto attivo di ioni e acqua da parte del trofoblasto verso l'interno della morula, in questa si viene a formare una cavità piena di liquido, il **blastocele**. Il liquido sposta l'ICM ad un polo dell'embrione, ora chiamato **blastocisti**, e rappresenta una prima fonte di nutrimento per le cellule embrionali. A seguito quindi dell'adesione e della penetrazione (**impianto**) della blastocisti nei tessuti dell'utero, le cellule dell'ICM si dispongono in due lamine epiteliali sovrapposte, **epiblasto** e **ipoblasto** diversamente orientate rispetto al trofoblasto e al blastocele. La prima, l'epiblasto, a contatto con il trofoblasto polare (quello che prende contatto con l'epitelio dell'endometrio), la seconda, l'ipoblasto, bagnata dal liquido del blastocele. Il diverso orientamento dell'epiblasto ed ipoblasto determina fin da ora la posizione dell'asse dorso-ventrale del futuro corpo dell'embrione. Tra l'epiblasto e il trofoblasto polare si forma un piccolo spazio che pure si riempie di liquido, la cavità proamniotica destinata a diventare la cavità dell'amnios, una specie di sacco all'interno del quale crescerà l'embrione. È ora tempo di sviluppare un **sistema di distribuzione dei nutrienti** a tutte le cellule che continuano ad aumentare rapidamente di numero. Inoltre, prima che inizino i processi differenziativi nell'epiblasto, è necessario assicurare la conservazione della specie. Per questa è richiesta la formazione delle cellule alle quali è affidata la riproduzione sessuale, le **cellule germinali**. Poiché le cellule germinali devono mantenere un genoma potenzialmente totipotente, mentre i processi differenziativi che stanno per iniziare nell'embrione restringeranno progressivamente la plasticità del genoma, le cellule precursori delle cellule germinali, le **cellule germinali primordiali**, devono rapidamente essere segregate per poter essere protette da influssi differenziativi che determinano le linee cellulari somatiche. La segregazione delle cellule germinali primordiali dipende in parte da meccanismi intrinseci alle cellule embrionali, ma soprattutto da segnali provenienti dai tessuti extraembrionali in via di formazione quali trofoblasto, epiblasto ed ipoblasto.

Nell'epiblasto inizia quindi la formazione dei tre tessuti primari dell'embrione, l'**ectoderma**, il **mesoderma** e l'**endoderma**, attraverso il processo chiamato **gastrulazione**. Con la formazione della **linea primitiva** e del **nodo di Hensen**, la gastrulazione non solo dà origine ai tessuti primari dell'embrione, tutti ad organizzazione epiteliale, ma determina la formazione dell'asse anteroposteriore (A-P) e della simmetria destra-sinistra (D-S) del corpo (vedi Capitolo 10). Inizialmente la gastrulazione, è indotta da segnali che provengono da tessuti extraembrionali ai quali subito si associano segnali tra le cellule dei tessuti in formazione. Iniziano così una serie di segnalazioni tra cellule che stimolano o inibiscono vie molecolari ed espressione di geni e che dirigono l'**istogenesi** (formazione dei tessuti) e l'**organogenesi** (formazione degli organi). Questi processi comportano proliferazione controllata nello spazio e nel tempo di gruppi di cellule, movimenti di lamine cellulari o gruppi di cellule, transizioni epitelio-mesenchima e viceversa, e non ultimo fenomeni di morte cellulare programmata, di cui parleremo più avanti. Tutti questi processi, sono controllati da segnali cellulari che si realizzano mediante tre principali modalità:

- interazioni ravvicinate (juxtacrine) tra le superfici delle cellule mediante molecole di varia natura, in particolare molecole di adesione;
- interazioni cellula-matrice extracellulare;
- segnali solubili di tipo autocrino, paracrino ed endocrino (Fig. 2-1).

Nell'embrione umano, alla fine del periodo embrionale (prime 8 settimane), i principali processi di istogenesi sono avvenuti o sono in atto e tutti gli organi sono già abbozzati. Nel rimanente periodo fetale si assisterà al differenziamento e ad una progressiva acquisizione delle attività funzionali dei tessuti nonché alla crescita dei vari organi.

## I GENI DELLO SVILUPPO EMBRIONALE

Un'osservazione piuttosto sorprendente è che il numero di geni codificanti proteine che controllano lo sviluppo e i processi della vita di un organismo vivente non è molto diverso in una mosca, in un topo o nell'uomo. Cellule di topo o di uomo hanno in comune circa il 98% di tali geni. La differente complessità delle strutture e dei comportamenti di questi organismi deriva soprattutto dalla diversa complessità della regolazione di questi geni e dei loro prodotti. In altre parole, è come se in un gruppo di bambini tutti avessero a disposizione gli stessi pezzi di una costruzione, ma ognuno schemi di costruzione diversi: uno per costruire una semplice casetta, uno per costruire un'automobile, un altro per una complessa astronave spaziale e così via.

Sebbene la complessità delle regolazioni e delle interazioni tra geni, RNA, proteine e gli altri tipi di molecole che compongono le strutture e le funzioni cellulari che controllano lo sviluppo dell'embrione siano spesso, soprattutto nell'uomo, solo parzialmente o affatto conosciute, i meccanismi molecolari di base di questi processi sono stati in parte svelati.

Il DNA che forma il genoma di una cellula può essere paragonato ad un software contenuto in duplice copia nel nucleo. Esso contiene le istruzioni sotto forma di un codice a quattro lettere (quattro nucleotidi, A, T, G, C), che determinano le strutture, le funzioni e il ciclo di vita di una cellula e di un organismo pluricelluare. Come noto, nel nucleo della cellula il codice del DNA viene trascritto sottoforma di vari tipi di RNA e tradotto poi in proteine nel citoplasma. Il sequenziamento del genoma umano ha permesso di stabilire che tutti i processi che sono alla base della vita di un individuo sono controllati da circa 28.000-40.000 geni. Questi costituiscono approssimativamente solo circa il 5% del DNA contenuto nel nucleo di

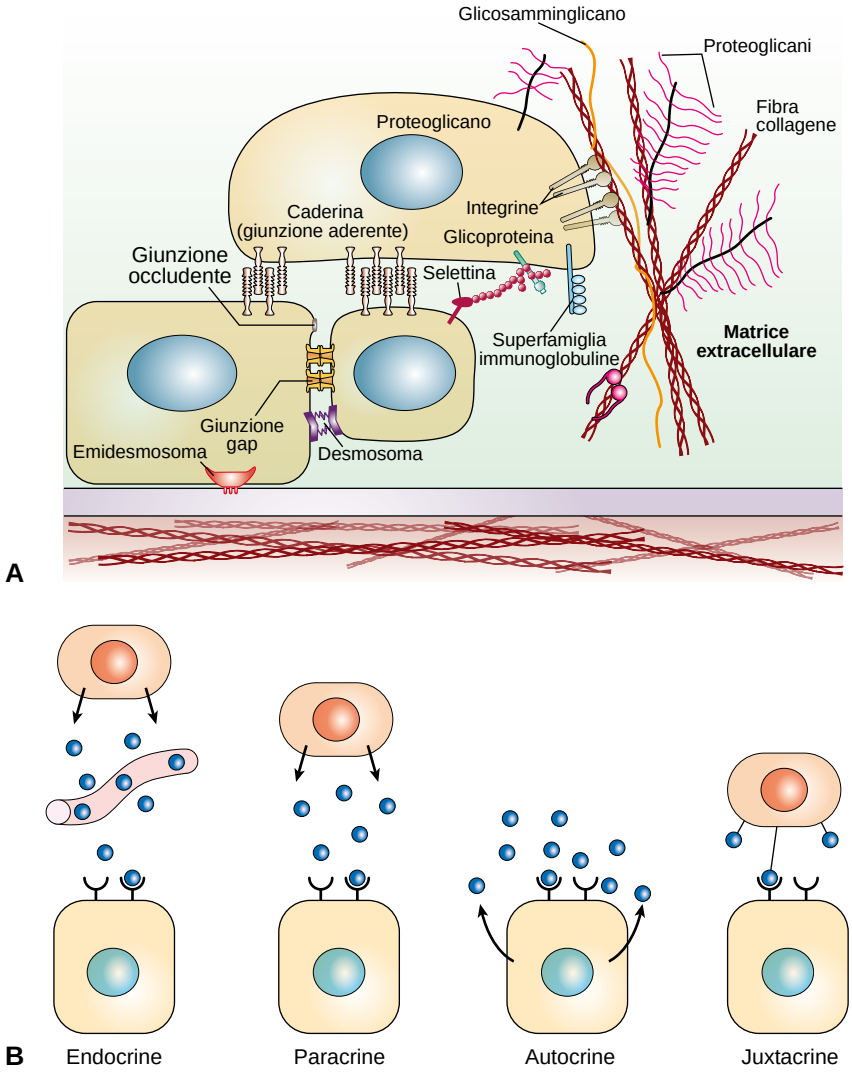



**FIGURA 2-1** ■ Rappresentazione schematica delle principali interazioni coinvolte nelle segnalazioni molecolari che controllano lo sviluppo embrionale a livello cellulare. *A)* Interazioni adesive cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare; *B)* Quattro modalità di segnalazioni molecolari tra cellule: endocrine, paracrine, autocrine e juxtacrine.

una cellula umana e si calcola che in ogni cellula siano attivi in ogni momento circa 2000-5000 geni. Comprendere lo sviluppo embrionale significa sostanzialmente capire come un gene o un gruppo di geni venga attivato o represso in una cellula o in un gruppo di cellule in un determinato momento e in una determinata regione dell'embrione e come questa attivazione modifichi il fenotipo e/o l'attività funzionale delle cellule.

Ma quanti sono i geni utilizzati durante lo sviluppo embrionale? Che cosa li distingue dagli altri geni? Quale ruolo essi svolgono nello sviluppo embrionale?

Una stima approssimativa del numero dei geni che controllano lo sviluppo è di circa 2000-4000 (circa il 10-20% del totale dei geni). La maggior parte di questi geni codifica per **fattori di trascrizione** e per **fattori di crescita** ed i loro **recettori**; un numero significativo di essi codifica inoltre per **proteine adesive**. Queste quattro tipologie di molecole sono i cosiddetti *players* (attori) principali dello sviluppo embrionale. Come sopra accennato, un carattere distintivo di questi geni è che la loro espressione è regolata nel tempo e nello spazio in specifici gruppi di cellule. La loro regolazione può avvenire, come per altre classi di geni, sia a livello trascrizionale (prima e durante la trascrizione di un gene) che post-trascrizionale (sugli RNA trascritti e sulla traduzione degli mRNA in proteine). Tuttavia, la struttura dei geni dello sviluppo ha alcune peculiari caratteristiche: presenza di più di un "enhancer" (intensificatore), lunghe regioni di DNA intergenico e lunghe regioni introniche. Tutti elementi che consentono un'ampia possibilità di regolazione dell'espressione. Inoltre, cosa molto importante, sono localizzati in regioni della cromatina con una conformazione "aperta" o facilmente apribile, che consente accesso della RNA polimerasi II (l'enzima che trascrive gli mRNA) al promotore del gene e quindi la sua trascrizione. Infine un altro elemento importante

che caratterizza questi geni è che il loro promotore è in grado di legare stabilmente le proteine della famiglia **PCG** (polycomb group) e **TrxG** (trithorax group), che assicurano il mantenimento rispettivamente dello stato inattivo e attivo del gene, anche quando lo stimolo inattivante o inibitorio è cessato. I geni dello sviluppo sostanzialmente codificano i segnali proteici/polipeptidici che le cellule embrionali si scambiano per proliferare o non proliferare, sopravvivere o morire, aderire tra loro o a molecole della matrice, muoversi o fermarsi, modificare la loro forma e sintetizzare molecole che ne determinano il fenotipo differenziato.

Al termine di questo paragrafo vogliamo puntualizzare che spesso i geni che controllano lo sviluppo embrionale sono espressi anche nell'individuo adulto dove possono controllare i processi di sviluppo e differenziamento che continuano ad avvenire in numerosi tessuti in condizioni normali o patologiche. Di particolare importanza è la nozione che spesso l'attività dei geni dello sviluppo embrionale si manifesta in cellule tumorali caratterizzate dalla perdita dei normali processi di controllo del ciclo proliferativo e del differenziamento cellulare.

Ma quali sono le molecole e le interazioni molecolari che guidano lo sviluppo di un nuovo individuo?

Abbiamo pensato di dedicare un capitolo del libro ad illustrare questi meccanismi di base per facilitare la comprensione dei processi molecolari che vengono poi trattati negli specifici capitoli. Dalla nostra esperienza risulta che spesso gli studenti rimangono confusi e disorientati leggendo un elenco di nomi di geni, fattori di crescita, fattori di trascrizione e di vie di segnalazione molecolari citati nella descrizione della formazione di una struttura o di un organo in una determinata regione dell'embrione e in un preciso arco di tempo. In realtà i principi di base che controllano la formazione di un tessuto e di un organo sono sorprendentemente sempre gli stessi e le molecole implicate appartengono a relativamente poche tipologie.

Naturalmente per capire questi meccanismi bisogna possedere alcune delle nozioni di base di biologia e chimica che riguardano la struttura delle molecole della cellula e la struttura della cellula e dei tessuti nonché sapere come è fatto un gene e come la sua espressione può essere regolata.

## MOLECOLE E MECCANISMI MOLECOLARI DELLO SVILUPPO DELL'EMBRIONE PRE-IMPIANTO

Man mano che dalla singola cellula uovo fecondata (zigote) si formano sempre più cellule, queste cominciano ad interagire tra loro scambiandosi segnali molecolari (interazioni cellula-cellula). In generale, come spiegheremo più avanti, i segnali tra cellule sono in grado di attivare alcune vie molecolari nel citoplasma e/o determinare l'espressione o l'inattivazione di geni nel nucleo.

Nei primissimi stadi di sviluppo, come abbiamo già riportato sopra e come vedremo nel Capitolo 9, nello zigote il genoma è silente, ovvero i geni non vengono trascritti, e le prime due o tre divisioni mitotiche (segmentazioni) delle cellule embrionali (blastomeri) avvengono utilizzando RNA e proteine accumulate nel citoplasma durante l'ovogenesi. Inoltre il ciclo cellulare dei blastomeri durante le segmentazioni è del tutto particolare e poco conosciuti sono i meccanismi che lo controllano. Appare chiaro, tuttavia, che esso non richiede l'aumento del volume della cellula madre e non sottostà ai controlli in G1 che caratterizzano il ciclo cellulare mitotico nella maggior parte delle altre cellule.

Prima dell'impianto dell'embrione nell'endometrio dell'utero, è probabile che molecole presenti nell'ovidutto e nell'utero, possano regolare alcune funzioni delle cellule dell'embrione e influenzare l'espressione di alcuni loro geni. Le prime classi di geni che vengono espressi dall'embrione umano tra lo stadio di 4 cellule e quello di morula comprendono geni che codificano per fattori di trascrizione alla base della totipotenza differenziativa delle cellule come **OCT4** (octamer-binding transcription factor 4), **SOX2** (SRY-box 2) e **Nanog** (dal termine celtico tir na nòg, cioè "terra dell'eterna giovinezza"), per enzimi che consentono di prevenire e riparare danni al DNA e quelli responsabili di cambiamenti delle metilazioni del DNA e degli istoni necessari alla riprogrammazione del genoma dei blastomeri. Che cosa attivi l'espressione di questi geni non è noto, ma oltre all'ambiente esterno, a cui abbiamo accennato sopra, sembra che, per quanto riguarda i geni della totipotenza, questi vengano attivati da vie molecolari che dipendono dai polipeptidi della famiglia di **WNT** (wingless and integration) e **TGF-β** (transforming growth factor-β) (come per esempio l'Attivina e Nodal). Queste proteine e i rispettivi recettori, delle quali è nota la funzione di regolatori del differenziamento cellulare e di cui tratteremo più avanti, cominciano difatti ad essere sintetizzate proprio in questo periodo dello sviluppo embrionale.

Le prime cruciali interazioni cellula-cellula di cui si può con certezza documentare la presenza nell'embrione preimpianto avvengono allo stadio di 8-16 cellule. Il processo in cui intervengono è chiamato **compattazione** ed è caratterizzato da un'adesione intima tra i blastomeri che rende difficile distinguerli singolarmente quando vengono osservati in vivo al microscopio ottico. La conseguenza della compattazione è la determinazione delle prime due linee differenziative dell'embrione, il **trofoblasto** che darà origine ai tessuti extraembrionali della placenta e l'**ICM**, da cui deriveranno i tessuti dell'embrione e di due dei suoi annessi, il sacco vitellino e l'amnios. La compattazione è regolata principalmente dall'adesione tra blastomeri mediata dalla proteina adesiva **E-caderina**. I blastomeri inizialmente esprimono E-caderina sull'intera superficie cellulare, ma successivamente, a seguito di una ridistribuzione di molecole nella regione corticale del citoplasma dei blastomeri più esterni, la E-caderina si concentra nella regione baso-laterale della membrana plasmatica, mentre microvilli e altre molecole si concentrano nella regione apicale di questi blastomeri. Questo prelude al loro differenziamento in trofoblasto. Le cellule del trofoblasto esprimono inoltre molecole adesive della famiglia delle **ICAM**

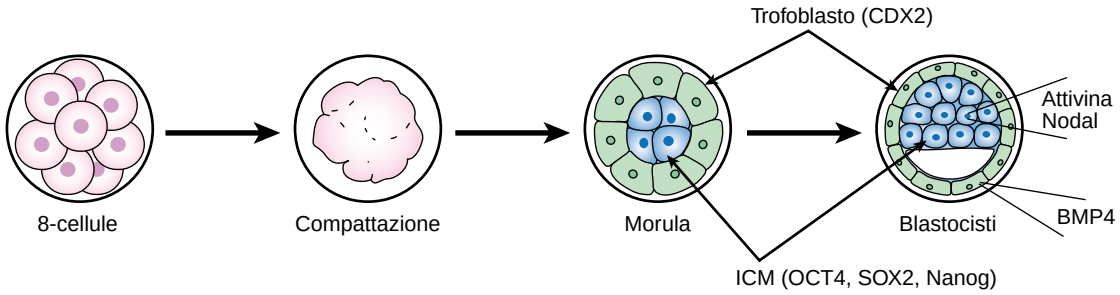



**Figura 2-2** ■ Primo evidente evento differenziativo nello sviluppo di un embrione di mammifero. A seguito della compattazione dei blastomeri, i blastomeri esterni differenziano in trofoblasto mentre i blastomeri interni in cellule della massa cellulare interna (ICM); le cellule del trofoblasto esprimono il gene *Cdx2* che ne determina il differenziamento, mentre le cellule dell'ICM esprimono i geni *Oct4*, *Sox2* e *Nanog* che le mantengono pluripotenti. Con la formazione della blastociti, fattori di crescita come Attivina e Nodal mantengono elevata l'espressione di *Oct4*, *Sox2* e *Nanog* nell'ICM, mentre BMP4 stimola nel trofoblasto l'espressione di *Cdx2*, che a sua volta inibisce i geni della pluripotenza.

(intercellular adhesion molecule), delle **Selettine** e delle **Integrine**. La ridistribuzione di molecole a cui si è fatto riferimento sopra, porta all'accumulo nelle cellule del trofoblasto di mRNA per il fattore di trascrizione **CDX2** (caudal type homeobox transcription factor 2). Recenti studi nel topo e in cellule embrionali staminali umane indicano che il differenziamento del trofoblasto, oltre che a tali cambiamenti, richiede l'azione di fattori di crescita. In particolare, la conservazione dello stato indifferenziato e pluripotente dei blastomeri che si conserva nell'ICM richiede la continua stimolazione da parte dell'Attivina e di Nodal che mantiene elevata l'espressione di OCT4, SOX2 e Nanog. La diminuzione dei livelli di Attivina e Nodal che si verifica nei blastomeri polarizzati, a seguito di un meccanismo non ancora identificato, favorisce la sintesi e secrezione di un altro fattore di crescita, il BMP4 (bone morphogenetic protein 4) e il loro differenziamento in trofoblasto. L'aumento di espressione e/o l'accumulo di mRNA per il fattore di trascrizione CDX2 nei blastomeri, a seguito della polarizzazione e/o della stimolazione di BMP4, causerebbe quindi l'inibizione dell'espressione di OCT4, SOX2 e Nanog (Fig. 2-2).

Il trofoblasto si specializza nell'instaurare rapporti adesivi e funzionali con i tessuti endometriali, mentre le cellule dell'ICM rimangono indifferenziate e pluripotenti. Come sopra descritto, a seguito del trasporto attivo di ioni e acqua verso l'interno dell'ICM si viene a formare una cavità piena di liquido, il **blastocele**. Le cellule dell'ICM si organizzano quindi in due lamine epiteliali sovrapposte, **epiblasto** e **ipoblasto** diversamente orientate rispetto al trofoblasto e al blastocele; l'epiblasto a contatto con il trofoblasto polare, l'ipoblasto a formare il tetto del blastocele. Questo processo rappresenta il secondo evento di differenziamento di linee cellulari divergenti nell'embrione. Nel topo è stato dimostrato che l'ipoblasto si forma a seguito della stimolazione da parte di FGF2 (fibroblast growth factor 2), e l'espressione dei fattori di trascrizione GATA4 (globin transcription factor 4), GATA6 e SOX17 (SRY-box 17) e inibizione di altri (per es., Nanog). Nanog invece continua ad essere espresso nelle cellule dell'epiblasto che esprime FGF4. È stato osservato, che l'espressione di diversi FGF (fibroblast growth factor 4) è controllata direttamente da OCT4 e Nanog e che tra lo stadio di 8 e 16 cellule, l'espressione degli FGF e dei loro recettori viene segregata in blastomeri diversi. Non è chiaro cosa determina questa segregazione, forse la diversa posizione delle cellule dell'ICM o l'asimmetria delle segmentazioni, ma la conseguenza è che nelle cellule con i recettori per FGF2, la segnalazione da parte di questo fattore causa la repressione dell'espressione di Nanog, mentre viene attivata quella di GATA4, GATA6 e SOX17. Anche nell'uomo i suddetti fattori di trascrizione guidano il differenziamento dell'ipoblasto, tuttavia la loro regolazione non sembra avvenire mediante i fattori di crescita FGF (Fig. 2-3).

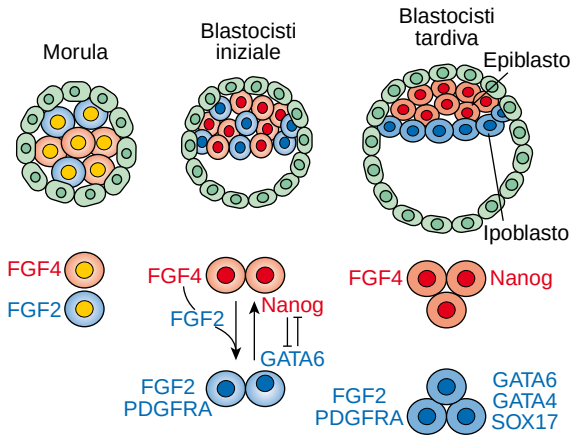



**Figura 2-3** ■ Differenziamento delle cellule dell'ICM in epiblasto e ipoblasto. L'espressione stocastica (casuale) di FGF4 (stimolato da OCT4 e SOX2) e FGF2 nelle cellule dell'ICM ne determina il differenziamento rispettivamente in cellule dell'epiblasto esprimenti Nanog e in cellule dell'ipoblasto esprimenti GATA6. Nanog e GATA6 si inibiscono a vicenda e determinano il differenziamento finale in epiblasto ed ipoblasto.

## MOLECOLE E MECCANISMI MOLECOLARI DELL'ISTOGENESI E ORGANOGENESI DELL'EMBRIONE

La **gastrulazione** segna in pratica l'inizio della formazione dei tessuti (istogenesi) embrionali primari. Questi sono di tipo epiteliale e comprendono come noto l'ectoderma, il mesoderma e l'endoderma. È nella formazione di questi tessuti che i segnali tra le cellule diventano sempre più complessi. Finché le dimensioni dell'embrione sono ridotte e gli spazi tra le cellule stretti, i segnali tra le cellule avvengono per contatto diretto (justacrino) mediante molecole presenti sulla membrana cellulare oppure sono di tipo autocrino o paracrino. Solo con la formazione del sistema di circolazione sanguigno e l'aumentare delle distanze tra le cellule, i segnali diventeranno anche endocrini. Quando a seguito delle interazioni cellula-cellula cominciano ad essere secrete molecole della cosiddetta **matrice extracellulare** (ECM, extracellular matrix), le cellule prendono ad interagire anche con queste molecole, per esempio per assumere una certa posizione o per muoversi o a volte addirittura semplicemente per poter sopravvivere (interazioni cellula-ECM). Dopo l'impianto, interazioni con l'ambiente esterno non svolgono un ruolo rilevante nello sviluppo dell'embrione se non quello di fornire un habitat idoneo alla sua sopravvivenza e ovviamente nutrienti. I tessuti della placenta, formano addirittura una barriera al libero passaggio di molecole provenienti dalla madre che potrebbero disturbare le interazioni tra le cellule dell'embrione in sviluppo. Formatesi i tessuti embrionali primari, questi cominciano ad organizzarsi in organi. Tale organizzazione coinvolge di nuovo segnali molecolari sempre più complessi di tipo autocrino, paracrino, endocrino e interazioni adesive tra cellule e tra cellule ed ECM.

I primi due eventi differenziativi che abbiamo sopra descritto, la formazione del trofoblasto e quella dell'ipoblasto e dell'epiblasto, esemplificano il ruolo fondamentale che i fattori di trascrizione, i fattori di crescita e l'adesione cellula-cellula svolgono nello sviluppo embrionale. Nei prossimi paragrafi vedremo chi sono queste molecole, come funzionano e come possono interagire tra loro nel regolare le attività cellulari alla base dell'istogenesi e dell'organogenesi, la proliferazione, il movimento, la morte programmata e il differenziamento.

## CHE COSA È E COME FUNZIONA UN FATTORE DI TRASCRIZIONE

I **fattori di trascrizione** (**TF**) sono delle proteine in grado di legarsi a specifiche sequenze di DNA e modulare l'attività della RNA polimerasi II, l'enzima responsabile della trascrizione degli mRNA, controllando così l'espressione di uno o più geni. Si stima che circa il 10% dei geni del genoma umano codifichino per TF, un dato che sottolinea l'importanza di questi fattori. L'espressione dei geni negli eucarioti è controllata principalmente a livello di inizio della trascrizione anche se in molti casi numerose modificazioni post-trascizionali dell'mRNA svolgono un ruolo determinante. Le sequenze di DNA regolatrici che si trovano generalmente vicino e a monte del sito di inizio della trascrizione (TATA box) sono chiamate i **promotori** del gene. Questi possiedono anche sequenze regolatrici, in genere lontano sia a monte che a valle della TATA box, chiamate ***enhancers*** (**intensificatori**). Esistono due grandi famiglie di fattori di trascrizione, i cosiddetti **fattori di trascrizione generali** e **fattori di trascrizione geni-specifici**. I primi sono implicati nella trascrizione di tutti i promotori da parte della RNA polimerasi II e si legano ad essa formando il macchinario di base della trascrizione, il cosiddetto **complesso di iniziazione** (Fig. 2-4). I secondi si legano alle sequenze di DNA

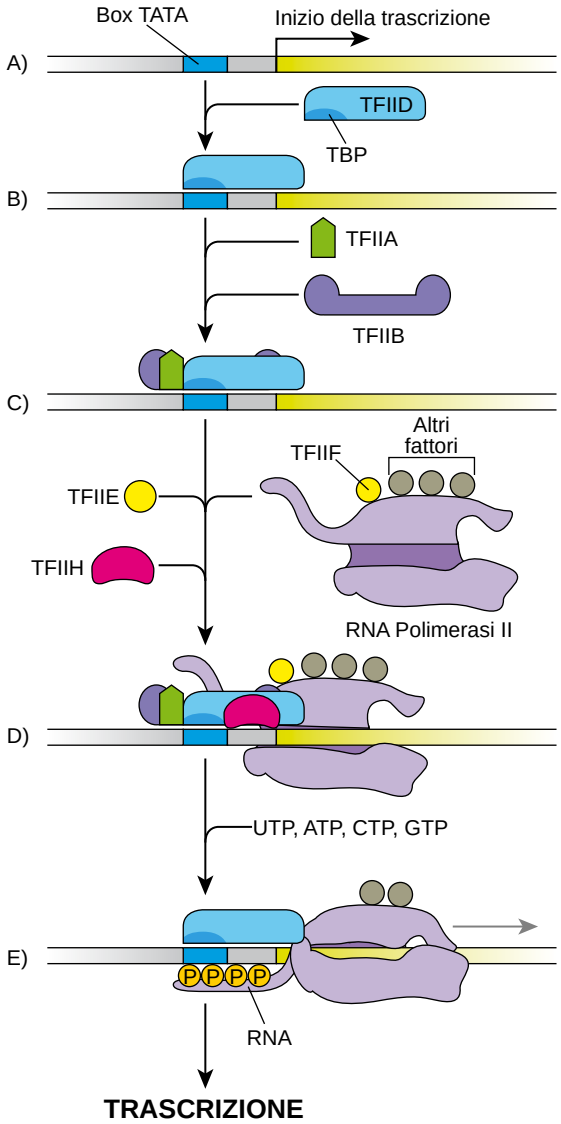



**Figura 2-4** ■ Schema dell'inizio della trascrizione di un gene da parte della RNA polimerasi II; questa richiede l'assemblaggio sequenziale di diversi fattori di trascrizione generali come TFIID (TBP = sequenza di riconoscimento della TATA box), TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIH al DNA e TFIIF ed altri alla RNA polimerasi che utilizzando i quattro nucleotidi fosforilati ATP, GTP, UTP e CTP inizierà la trascrizione.

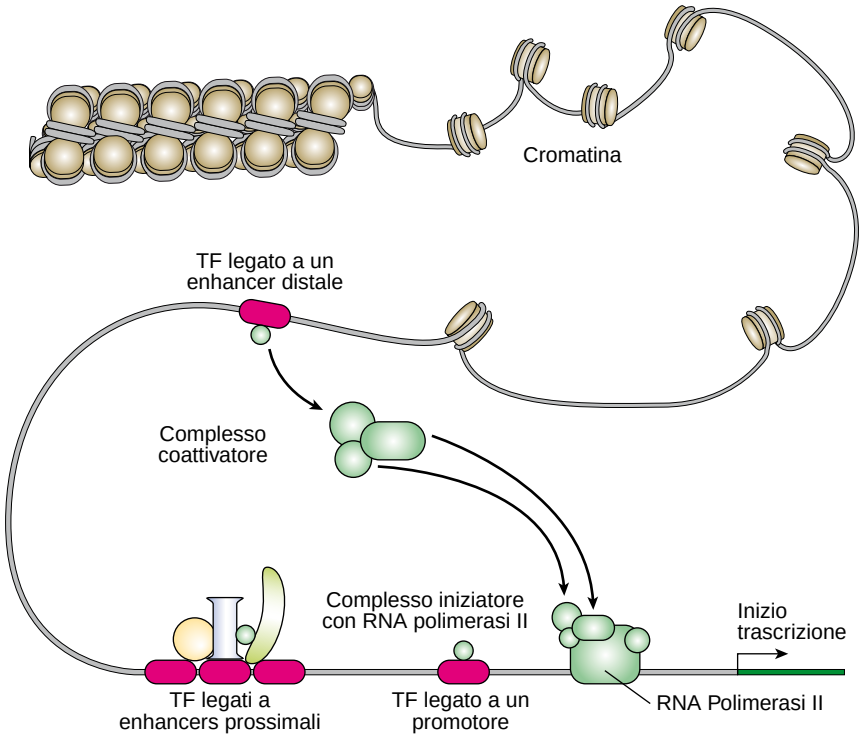



**FIGURA 2-5** ■ Schema della regolazione della trascrizione da parte di fattori di trascrizione geni-specifici. I TF si legano ad enhancers e ai promotori in modo tale da permettere ad un complesso coattivatore di legarsi alla RNA polimerasi II ed iniziare la trascrizione.

che controllano l'espressione di specifici geni (promotori ed intensificatori) e sono quindi responsabili della regolazione della loro espressione (Fig. 2-5). Questa seconda famiglia di TF è quella maggiormente implicata nel controllo dello sviluppo embrionale.

Bisogna sottolineare che i TF rappresentano solo uno dei livelli di regolazione della trascrizione genica utilizzati nelle cellule eucaristiche. **Modificazioni strutturali** ed **epigenetiche** della cromatina precedono o seguono l'azione dei TF, mentre numerosi ulteriori **controlli post-trascrizionali** avvengono sugli RNA trascritti. Un ulteriore livello di controllo riguarda infine la traduzione degli mRNA a livello dei ribosomi e le modificazioni post-traduzionali di una proteina (Fig. 2-6). Difatti come noto, negli eucarioti il DNA è assemblato con le proteine istoniche nella cromatina. Ne consegue che lo stato di organizzazione della cromatina e modificazioni degli istoni giocano un ruolo chiave nel controllo della trascrizione genica. Modificazioni degli istoni (metilazioni, acetilazioni, fosforilazioni) e processi di metilazione e demetilazione del DNA costituiscono modificazioni della cromatina chiamate epigenetiche, ovvero che non

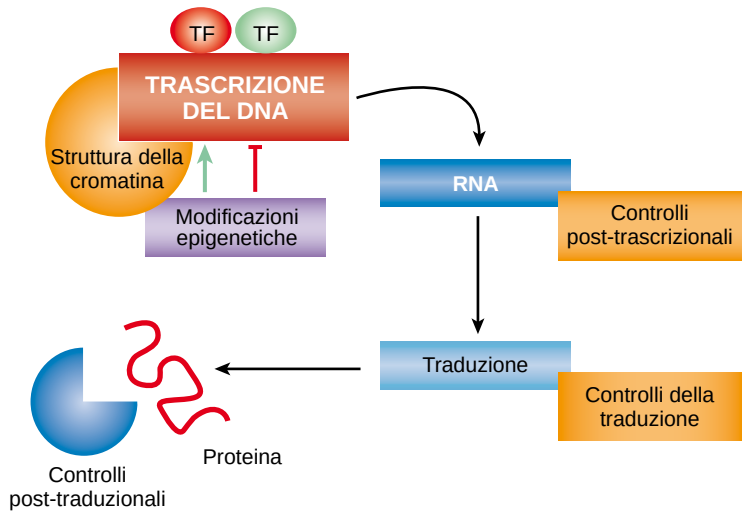



**FIGURA 2-6** ■ Schema dei diversi livelli di controllo dell'espressione di un gene e di una proteina.

**TABELLA 2-1**
Esempi di fattori di trascrizione geni-specifici

| Fattore | Tipo di struttura | Sequenza di DNA riconosciuta |
|---|---|---|
| SP1 | Zinc finger (dito di zinco) | 5'-GGGCGG-3' |
| AP-1 | Basic zipper (cerniera basica) | 5'-TGA(G/C)TCA-3' |
| C/EBP | Basic zipper (cerniera basica) | 5'-ATTGCGCAAT-3' |
| Dattore da "shock" di calore | Basic zipper (cerniera basica) | 5'-XGAAX-3' |
| ATF/CREB | Basic zipper (cerniera basica) | 5'-TGACGTCA-3' |
| c-Myc | Basic helix-loop-helix (elica basica-elica-passante) | 5'-CACGTG-3' |
| OCT-4 | Helix-turn-helix (elica-giro-elica) | 5'-ATGCAAAT-3' |
| NF-1 | Novel (insolita) | 5'-TTGGCXXXXXGCCAA-3' |

(G/C) = G or C; X = A, T, G or C

comportano modificazioni del codice del DNA, e rappresentano un'importante modalità di regolazione dell'espressione genica. Un'odierna area di ricerca particolarmente importante si basa sulla scoperta di RNA non codificanti di grandi o piccole dimensioni (piccoli RNA, mini RNA e micro RNA), ovvero che non vengono tradotti in proteine, che regolano la trascrizione o la traduzione di altri RNA.

**TABELLA 2-2**
Classificazione dei fattori di trascrizione sulla base delle sequenze di aminoacidi (domini)

| Superclasse* | Classe |
|---|---|
| 1. Dominio basico (b) (395) | Leucine zipper factors (bZIP, fattori a cerniera di leucina)<br>Helix-loop-helix factors (bHLH, fattori a elica-passante-elica)<br>Helix-loop-helix factors/leucine zipper factors (bHLH-ZIP, fattori a elica-passante-elica/fattori a cerniera di leucina)<br>CTF/NF-1<br>RF-X<br>Helix-span-helix factors (bHSH, fattori a elica-apertura-elica) |
| 2. Domini che legano il DNA dipendenti da zinco (207) | Cys4 zinc finger of nuclear receptor type (Dito di zinco con 4 cisteine [Cys4])<br>Diverse Cys4 zinc fingers (Dito di zinco diverso da quello con Cys4)<br>Cys2His2 zinc finger domain (Dito di zinco con Cys4 e 2 istidina [Nis2])<br>Cys6 cysteine-zinc cluster (Gruppo a dito di zinco con Cys6)<br>Zinc fingers of alternating composition (Dita di zinco con composizione alternante) |
| 3. Elica-giro-elica (522) | Homeo domain (Omeo-dominio)<br>Paired box (Scatola appaiata)<br>Fork head/winged helix (Testa biforcata/elica alata)<br>Heat shock factors (Fattori da shock da calore)<br>Tryptophan clusters (Gruppi di triptofano)<br>TEA domain (Dominio di transattivazione [TEA]) |
| 4. Fattori a struttura β/con contatti nel solco minore (205) | RHR (Rel homology region) (Regione omologa a Rel)<br>p53<br>MADS box (scatola MADS)<br>β-Barrel α-helix transcription factors (Fattori di trascrizione con α-elica a forma di β-barile)<br>TATA-binding proteins (Proteine che legano TATA)<br>HMG<br>Heterometic CCAAT factors (Fattori CCAAT eterometrici)<br>Grainyhead (Testa granulosa)<br>Cold-shock domain factors (Fattori da shock da freddo)<br>Runt (Omuncolo) |
| 5. Altri fattori di trascrizione (29) | Copper fist proteins (Proteine a pugno di rame)<br>HMGI(Y)<br>STAT<br>Pocket domain (Dominio a tasca)<br>E1A-like factors (Fattori tipo E1A) |

* In parentesi, il numero dei TF.

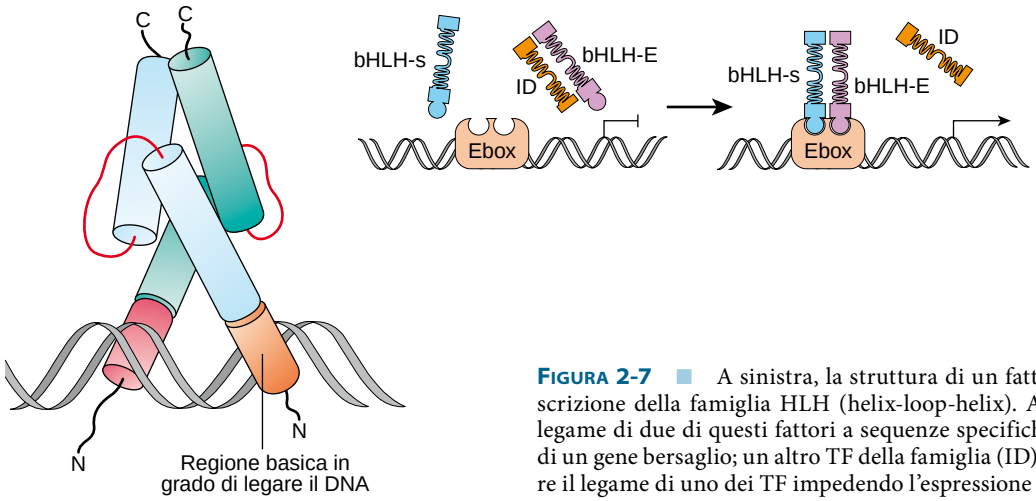



**FIGURA 2-7** ■ A sinistra, la struttura di un fattore di trascrizione della famiglia HLH (helix-loop-helix). A destra, il legame di due di questi fattori a sequenze specifiche di DNA di un gene bersaglio; un altro TF della famiglia (ID) può inibire il legame di uno dei TF impedendo l'espressione del gene.

## Classificazione dei fattori di trascrizione

I TF possono essere classificati sulla base di tre caratteristiche:

- meccanismo di azione;
- modo di regolazione della loro funzione;
- sequenze omologhe nelle loro regioni (domini) che legano il DNA.

Nel primo gruppo rientrano le due famiglie sopra descritte i **fattori di trascrizione generali** (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, and TFIIH) e **geni-specifici** (Tab. 2-1).

I fattori di trascrizione geni-specifici vengono suddivisi in due gruppi sulla base del modo in cui la loro funzione viene regolata: TF sempre attivi in tutte le cellule e TF che richiedono attivazione. Questa avviene attraverso un fine controllo della loro espressione, ma spesso anche a seguito di una modificazione conformazionale (per esempio fosforilazioni in serina, treonina o tirosina). Entrambi questi processi dipendono da segnalazioni molecolari extracellulari o intracellulari.

La classificazione dei TF sulla base delle loro sequenze di aminoacidi (domini) con la quale si legano al DNA suddivide i TF in cinque superclassi ognuna formata da diverse classi (Tab. 2-2). La Figura 2-7 illustra la struttura di una delle classi di TF, chiamata "basic helix-loop-helix" (bHLH), coinvolta in alcuni importanti processi dello sviluppo embrionale come il differenziamento delle cellule muscolari e nervose.

## CHE COSA È E COME FUNZIONA UN FATTORE DI CRESCITA

In una definizione generale un **fattore di crescita** (**GF**) è una molecola in grado di regolare diverse attività cellulari come la proliferazione, la sopravvivenza e lo stesso differenziamento attivando in una cellula una o più vie molecolari nel citoplasma che possono o meno convergere nell'attivazione/repressione di uno o più geni. Uno stesso GF può avere contemporaneamente più funzioni in una cellula ed effetti diversi, anche opposti, in un'altra cellula. In questa definizione in realtà rientrano una miriade di molecole di diversa natura, come per esempio gli ormoni prodotti dalle cellule endocrine e le citochine prodotte dalle cellule linfo-emopoietiche. Va ricordato che una stessa molecola è considerata un GF, un ormone o una citochina a seconda del tipo cellulare che la produce e delle specifiche funzioni che essa svolge.

In questo paragrafo limiteremo la nostra descrizione ai fattori di crescita che hanno un ruolo chiave nello sviluppo embrionale. La maggior parte dei fattori di crescita coinvolti nello sviluppo embrionale sono dei polipeptidi, ovvero delle proteine a basso peso molecolare formate da alcune decine e fino a circa 100-150 aminoacidi. Sulla base della loro struttura molecolare e funzione, i GF vengono suddivisi in dieci gruppi o famiglie o superfamiglie (Tab. 2-3). Essi vengono indicati con acronimi o sigle che fanno di solito riferimento alla funzione per la quale sono stati originariamente scoperti. Pere esempio, il primo fattore di crescita neurale scoperto negli anni '50 da Rita Levi Montalcini (Premio Nobel per la Medicina nel 1986), è stato chiamato **NGF** (nerve growth factor) in quanto promuoveva la crescita degli assoni di

**TABELLA 2-3**
Principali famiglie di fattori di crescita

| |
|---|
| PDGF (PDGF-A, PDGF-B, CSF1, M-CSF1, SCF, Flt3) |
| VEGF (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, PlGF 1,2) |
| EGF (EGF, TGFα, AR, HB-EGF, NRG) |
| FGF (FGF-1-22) |
| Insulina (IGFI, II, HGF, Neurotrofine: NGF, BDNF, NT3-6) |
| Efrine (EPH-A, EPH-B) |
| Hedgeog (SHH, DHH, IHH) |
| GDNF (GDNF, NTN, ART, PSPN) |
| Superfamiglia del TGFβ (TGFβ, BMPs, attivine, inibine, Nodal, VGR1) |
| WNT (WNT1-19) |

**TABELLA 2-4**
Principali classi di recettori di membrana per fattori di crescita

| |
|---|
| Recettori associati a proteine G |
| Recettori ad attività proteina-tirosina chinasi |
| Recettori associati a proteine-tirosina chinasi citoplasmatiche |
| Recettori ad attività proteina-serina/treonina chinasi |
| Recettori associati a proteina-tirosina fosfatasi, guanilato ciclasi o proteasi |

alcuni tipi di neuroni. Oggi è noto che questo fattore agisce anche su cellule non neuronali per esempio sui linfociti B, dei quali favorisce la sopravvivenza.

Per ogni fattore di crescita polipeptidico esiste di norma un **recettore specifico** (Tab. 2-4), a sua volta un polipeptide/proteina o un complesso di polipeptidi/proteine, in grado di legare il fattore di crescita in modo specifico. Il fattore di crescita è definito quindi ligando del suo recettore. Le cellule espongono sulla loro membrana plasmatica allo stesso tempo diversi recettori per fattori di crescita ed ovviamente un fattore di crescita può esercitare il suo effetto solamente sulle cellule che esprimono il relativo recettore.

Per comprendere come un fattore di crescita possa controllare la proliferazione, la sopravvivenza e/o il differenziamento di una cellula, è dunque necessario conoscere i meccanismi attraverso i quali i recettori di superficie trasmettono nella cellula bersaglio il segnale innescato dal legame con il proprio ligando. La maggior parte dei recettori dei fattori di crescita polipeptidici regolano l'attività di proteine intracellulari. Queste proteine trasmettono il segnale dal recettore, un processo chiamato **trasduzione del segnale intracellulare**, ad una serie di altri bersagli intracellulari, rappresentati spesso da fattori di trascrizione. Il legame del fattore di crescita con il suo recettore inizia una catena di reazioni intracellulari che possono espletarsi nel citoplasma e/o raggiungere il nucleo, modificando l'espressione genica.

Ci sono dei fattori di crescita che regolano alcuni importanti processi dello sviluppo embrionale che non sono polipeptidi. Tra questi ricordiamo gli **ormoni steroidei**, che sono dei lipidi, e l'**acido retinoico** (RA) che deriva dalla vitamina A, chimicamente definita come un isoprenoico. Questi fattori di crescita possono penetrare direttamente nel citoplasma dove si legano a proteine recettoriali, quindi trasportati nel nucleo si legano ad intensificatori e promotori di specifici geni inibendo o più spesso attivandone la trascrizione.

## Come un fattore di crescita può modificare la proliferazione, la sopravvivenza e il differenziamento di una cellula

Gran parte dello sviluppo embrionale procede sulla base di segnali chimici che vengono inviati da specifiche popolazioni di cellule per espletare un'azione biologica su un'altra popolazione di cellule. I fattori di crescita rivestono un ruolo fondamentale nella determinazione del destino differenziativo delle cellule nel corso dello sviluppo embrionale. Lo sviluppo dei tessuti nonché la loro rigenerazione avviene in un microambiente contenente differenti fattori di crescita. Queste molecole regolano diversi processi dello sviluppo cellulare come: la sopravvivenza, proliferazione, differenziamento, migrazione e, in generale, tutti gli aspetti del comportamento di una cellula sono tutti influenzati dall'equilibrio tra segnali stimolatori e inibitori. Il chiaro effetto funzionale di un dato fattore di crescita è determinato dal tipo di cellule rispondenti, dalla concentrazione o dalla durata di esposizione ad una molecola segnale e soprattutto dalla contemporanea presenza di altri stimoli. Queste specifiche caratteristiche biologiche permettono ad un relativamente limitato numero di fattori di crescita di espletare una varietà di funzioni sotto differenti circostanze in modo tale che una stessa molecola di segnalazione possa essere utilizzata in momenti diversi e in luoghi diversi nel corso di tutto lo sviluppo embrionale. La maggioranza delle molecole di segnalazione fanno parte di grandi famiglie di molecole con analogie strutturali. La specifica sequenza di azione di un fattore di crescita o molecola di segnalazione (ligando) sul proprio recettore, evoca una trasduzione del segnale e quindi una risposta biologica, viene comunemente definita via di segnalazione (*signaling pathway*). In questo paragrafo saranno brevemente trattate le principali famiglie di fattori di crescita importanti nella guida dello sviluppo embrionale.

### Superfamiglia del TGF-β

La superfamiglia dei fattori di crescita del "transforming growth factor β" (TGF-β) (così denominata in quanto la prima molecola di questa famiglia è stata isolata da cellule trasformate da virus), che consiste di oltre 30 molecole tra le quali i **TGF-β**, le "bone morphogenetic proteins" (**BMP**), "growth and differentiation factors" (**GDF**), **attivine** e **Nodal**, è estremamente importante nello sviluppo e nell'omeostasi dei metazoi. Le molecole coinvolte nella segnalazione di questi fattori sono molto ben conservate durante l'evoluzione e regolano differenti funzioni cellulari come la crescita, adesione, migrazione, apoptosi e differenziamento. Le azioni biologiche di questi fattori di crescita sono modulate nello spazio e nel tempo nel corso di tutto lo sviluppo embrionale e questo risulta in una grande diversità di risposte cellulari. La via di segnalazione meglio caratterizzata utilizzata da questi fattori di crescita è apparentemente semplice e lineare. I ligandi della superfamiglia del TGF-β, in forma di dimeri inattivi stabilizzati da ponti disolfuro intermolecolari (ogni molecola consiste di un grande pro-dominio e una regione bioattiva C-terminale di 112 aminoacidi) vengono secreti dalla cellula. Il dimero diviene biologicamente attivo solo dopo la dissociazione del pro-dominio dalla regione bioattiva e diventa in grado di attivare complessi eteromerici di recettori transmembrana di tipo I e II (recettori con attività serina-treonina chinasi). Esistono nel genoma umano sette **recettori del tipo I** (ALK 1-7) e cinque **recettori del tipo II**. Il ligando induce l'associazione dei recettori in un complesso eterotetramerico in cui il

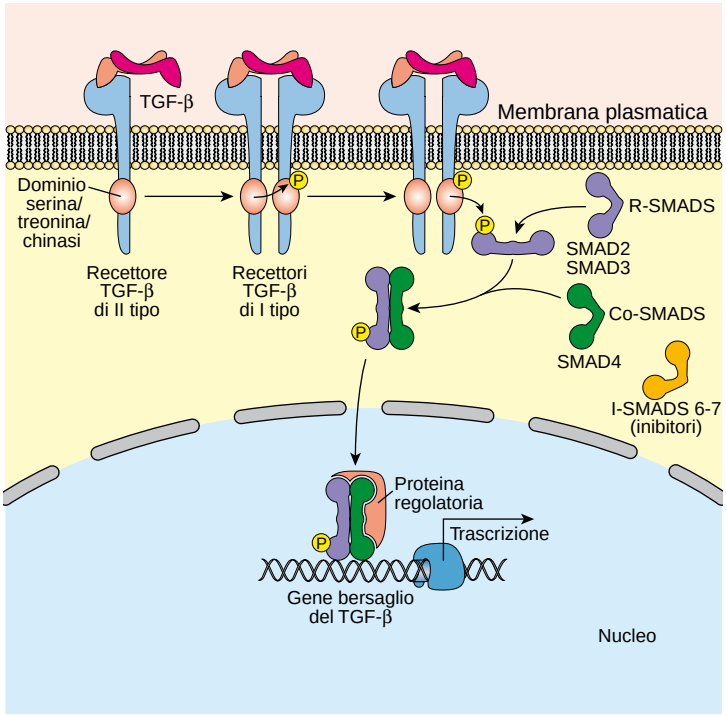



**Figura 2-8** ■ Meccanismo molecolare di segnalazione dei fattori di crescita della superfamiglia del TGF-β attraverso le molecole SMADS. Complessi recettoriali eterotetramerici vengono attivati dal ligando in forma di dimero causando la fosforilazione del recettore di tipo I, il quale a sua volta fosforila le molecole effettrici a valle, le R-SMAD. Le differenti isoforme delle molecole fosforilate R-SMADS formano complessi molecolari l'una con l'altra e con la co-SMAD4; questi complessi molecolari si accumulano nel nucleo dove, insieme ad alcuni fattori di trascrizione, regolano positivamente e negativamente l'espressione dei moltissimi geni bersaglio del TGF-β. Una volta attivati, i recettori del TGF-β possono essere regolati negativamente dalle SMAD inibitorie (I-SMAD); il legame del recettore alle I-SMAD induce l'ubiquitinazione e la degradazione dei recettori.

recettore di tipo II fosforila e attiva i recettori di tipo I. I recettori attivati divengono quindi in grado di fosforilare alcuni mediatori intracellulari tra i quali, le molecole più studiate sono le **SMAD** (small mother against decapentaplegic) (R-SMADS, Co-SMADS, I-SMADS). Tali molecole formano, quindi, dei complessi molecolari tra loro e con altre proteine, per modulare la trascrizione di geni bersaglio nel nucleo (Fig. 2-8). È interessante sottolineare che si possono creare molte diverse combinazioni di ligando-recettore nonché di differenti complessi tra recettori di tipo I e II, determinando in tal modo un'enorme diversità nella generazione delle vie di segnalazione all'interno della cellula.

Uno dei più importanti livelli di controllo del "signaling" dei fattori della superfamiglia del TGF-β è costituito dalla regolazione della disponibilità del ligando, in quanto il legame di questi fattori con molecole ad azione antagonista (tra le quali, Chordin, Follistatin, Noggin [Cordina, Follistatina, Noggina]) ne inibisce l'azione biologica. Questo fenomeno è particolarmente importante per la creazione di gradienti quali, per esempio, quelli che si vengono a creare per la determinazione degli assi corporei (vedi Capitolo 10). È comunque necessario precisare che sono state caratterizzate anche differenti vie di "signaling" del TGF-β che sono Smad-indipendenti.

## Famiglia dei fattori Hedgehog

La famiglia di fattori **Hedgehog** rappresenta una fondamentale classe di fattori paracrini che riveste un'importanza cruciale nel corso dello sviluppo embrionale. Nei vertebrati, la famiglia Hedgehog è rappresentata da almeno tre membri dal nome suggestivo: **Desert hedgehog** (DHH), **Indian hedgehog** (IHH) e **Sonic hedgehog** (SHH). La via di segnalazione di Hedgehog avviene attraverso due proteine recettoriali, **Patched** (PTC), una proteina con dodici domini transmembrana che si lega al ligando Hedgehog, e **Smoothened** (SMO), una proteina con sette domini transmembrana che trasmette un segnale a valle. In assenza del ligando Hedgehog, PTC inibisce l'attività SMO, e geni bersaglio a valle vengono inattivati da una forma processata di repressore trascrizionale, Cubitus interruptus (Ci) in Drosophila o GLI-1,2,3 nei vertebrati. Per avviare la segnalazione, le proteine Hedgehog vanno incontro ad un processo autocatalitico e ad una modifica che porta il loro dominio N-terminale a legare il colesterolo. In conseguenza del legame di Hedgehog al recettore PTC, SMO diviene attivata, la fosforilazione e la scissione di Ci/GLI viene inibita, e la proteina non processata Ci/GLI trasloca nel nucleo per attivare la trascrizione dei geni bersaglio (Fig. 2-9). La via di segnalazione di SHH nei vertebrati è coinvolta in diversi processi dello sviluppo embrionale, tra cui la neurogenesi, ematopoiesi, la formazione dell'osso e lo sviluppo delle gonadi.

## Famiglia dei fattori WNT

La famiglia delle proteine **WNT** costituiscono un'importante classe di molecole segnale che determinano e influenzano una grande varietà di processi dello sviluppo embrionale e, nei mammiferi, alcune molecole di questa famiglia rivestono anche un ruolo fondamentale durante il periodo della gastrulazione. Dall'identificazione del primo gene *Wnt* nel 1982 (scoperto come un oncogene, denominato Int, che causava tumori della ghiandola mammaria) ad opera dei ricercatori Roel Nusse e Harold Varmus, la famiglia dei geni *Wnt*, che

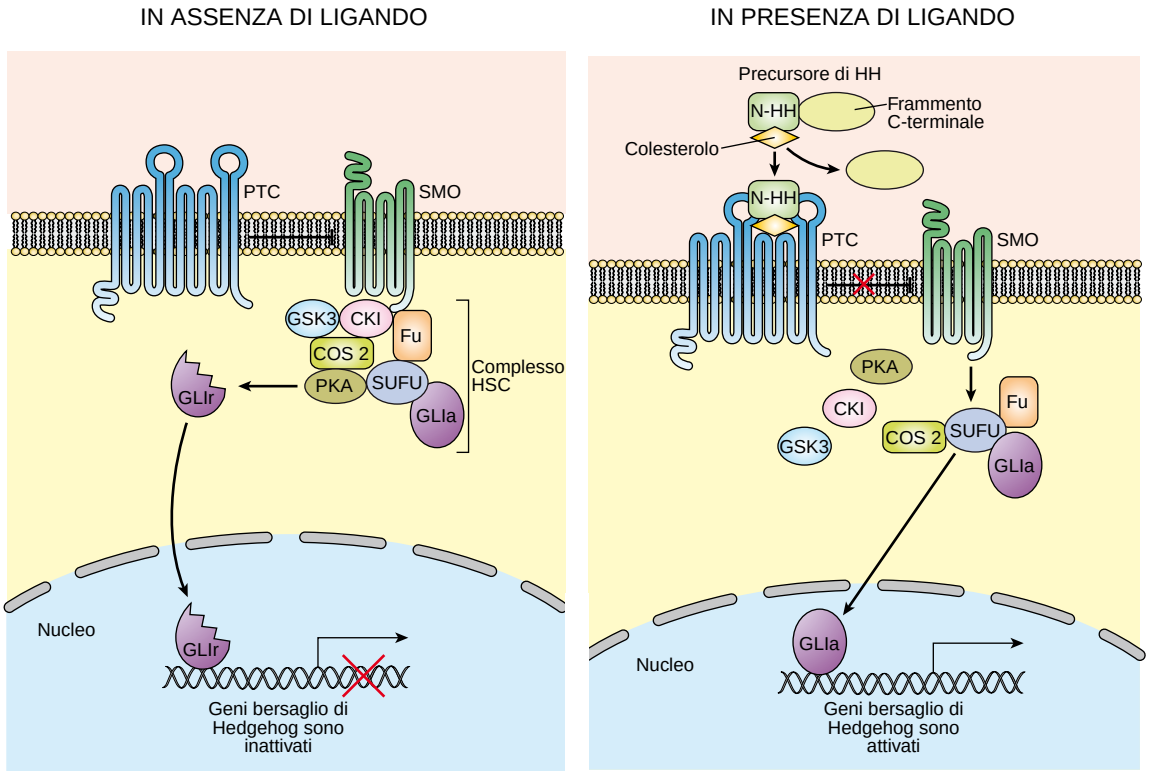



**Figura 2-9** ■ Via di segnalazione dei fattori Hedgehog. Il precursore di Hedgehog (HH) va incontro ad un processo autocatalitico per azione della porzione C-terminale; il frammento N-terminale della molecola diviene in grado di legare il colesterolo (N-HH). In assenza del ligando Hedgehog (N-HH/colesterolo), il recettore Patched (PTC) reprime il recettore Smoothened (SMO) prevenendo l'attivazione del "signaling" di Hedgehog; il complesso di segnalazione di Hedgehog (HSC) è associato a SMO/microtubuli e le chinasi PKA, CK1 e GSK3 fosforilano Ci/GLI e questo induce il taglio proteolitico della proteina che esita nella generazione di una forma processata amino terminale di Ci/GLI, la GLIr (repressore trascrizionale) che entra nel nucleo e inibisce l'espressione dei geni bersaglio. In presenza di N-HH gli effetti inibitori di PTC sul recettore SMO sono rimossi e il complesso molecolare HSC diviene libero dall'interazione con SMO/microtubuli. In questa condizione la PKA, CK1 e GSK3 vengono rilasciate da COS2 precludendo la fosforilazione e la proteolisi di Ci/GLI. La proteina Ci/GLI "full lenght" non processata (GLIa), non più inibita è libera di entrare nel nucleo per attivare la trascrizione dei geni bersaglio di Hedgehog. Il complesso di segnalazione di Hedgehog (HSC) è costituito da: GLIa; Fu, Fuse serina-treonina chinasi; COS2, chinesina tipo Costal2; SUFU, soppressore di Fused. COS2 è legata alle chinasi: PKA, protein chinasi A; CK1, caseina chinasi 1; GSK3, glicogeno sintetasi chinasi3.

nell'uomo è costituita da 19 geni indipendenti (il nome Wnt deriva da una combinazione di *Int* "integration" e *Wg* "wingless" nella *Drosophila*), è stata trovata in tutte le specie animali studiate. La famiglia delle proteine WNT regola molti stadi dello sviluppo embrionale, dalla prima divisione dello zigote alla determinazione degli assi embrionali e generazione dei tessuti, fino alla regolazione del movimento cellulare, della polarità, dell'orientamento degli assoni e della formazione delle sinapsi. Le proteine WNT, di 350-400 aminoacidi, vanno incontro a modificazioni post-traduzionali quali glicosilazione e palmitoilazione e sono quindi secrete dalla cellula. I primi recettori delle proteine WNT ad essere identificati sono stati quelli appartenenti alla famiglia di recettori con sette domini transmembrana denominati **Frizzled** (**FZ**), dieci dei quali sono codificati nel genoma umano. Oltre ai recettori FZ, la via di segnalazione canonica **WNT/β-catenina** richiede la presenza di proteine recettoriali a singolo dominio transmembrana note come ***LRP*** (LDL-receptor related protein). La fosforilazione della β-catenina costituisce un livello di regolazione cruciale della via di segnalazione di WNT. L'interazione della proteina WNT ai suoi recettori causa l'attivazione di proteine citoplasmatiche quali le proteine Dishevelled (DVL) che diventano in grado di legare e reclutare un complesso molecolare formato dalla caseina chinasi 1 (CK1), glicogeno sintetesi 3 (GSK3), Axin e la proteina APC (complesso di degradazione della β-catenina). In assenza di stimolazione di WNT, la molecola di segnalazione intracellulare β-catenina viene fosforilata dal complesso di degradazione della β-catenina e quindi indirizzata alla degradazione proteolitica via ubiquitina-proteasoma. Conseguentemente alla stimolazione con WNT, al contrario, la fosforilazione e la degradazione della β-catenina viene in qualche modo inibita e quindi l'accumulo di β-catenina in associazione con i fattori di trascrizione TCF/LEF causa l'attivazione della trascrizione dei geni responsivi a WNT (Fig. 2-10). La via di segnalazione di WNT è evolutivamente conservata e le sue funzioni sono cruciali anche in specie molto

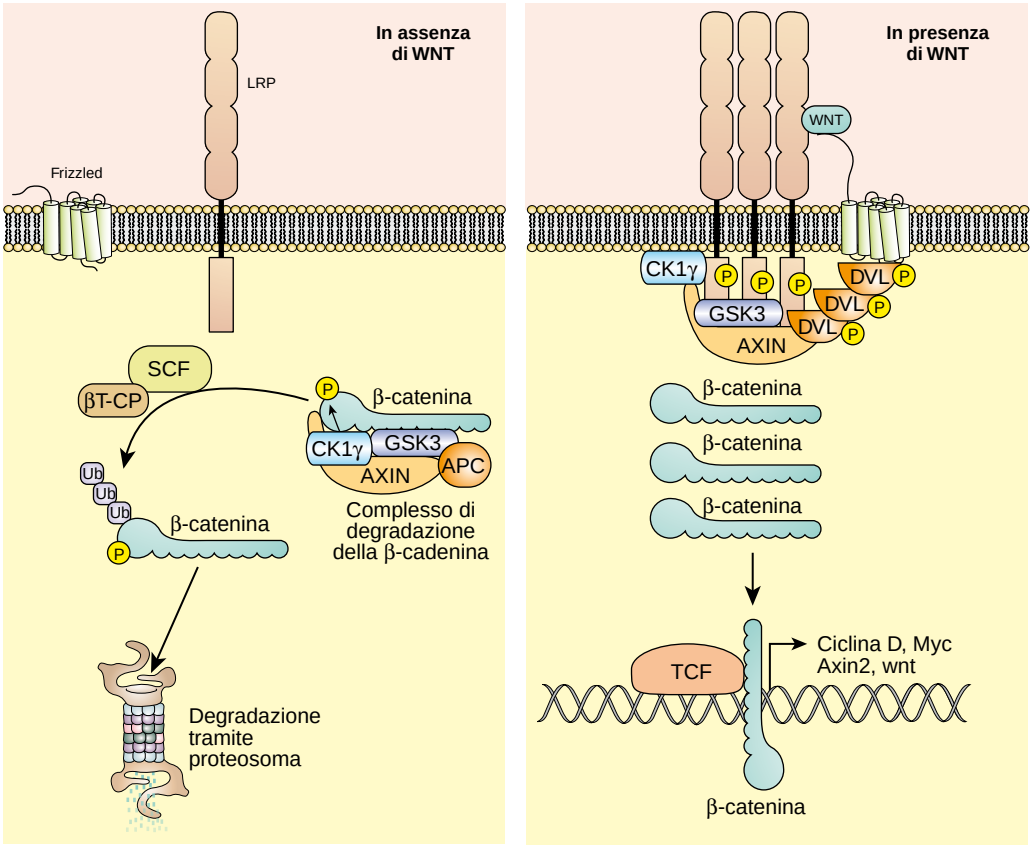



**Figura 2-10** ■ Schema generale della via di segnalazione di WNT/β-catenina. In assenza di WNT la β-catenina è legata al Complesso di degradazione della β-catenina, fosforilata in sequenza dalla CK1 e dalla GSK3 e continuamente degradata via il sistema ubiquitina-proeteasoma. In presenza di WNT, il recettore Frizzled interagisce con il co-recettore LRP e questo risulta sia nell'oligomerizzazione del recettore LRP dipendente dalla proteina Dishevelled (DVL) sia nella sua fosforilazione mediata da CK1γ/GSK3 con la conseguenza che la proteina strutturale Axin viene reclutata alla membrana plasmatica attraverso il legame con LRP. Il legame della proteina Axin al complesso recettoriale citoplasmatico inibisce direttamente o indirettamente la fosforilazione della β-catenina. L'accumulo di β-catenina non fosforilata (con la funzione di co-attivatore) nel nucleo in associazione ai fattori di trascrizione TCF causa l'attivazione trascrizionale dei geni bersaglio di WNT.

lontane fra loro, dal moscerino della frutta all'uomo. È interessante evidenziare che le proteine WNT oltre ad essere essenziali nello sviluppo embrionale, rivestono un ruolo importante anche nell'omeostasi dei tessuti dell'adulto ed, infatti, sono state descritte mutazioni lungo la via di segnalazione di WNT che causano malattie degenerative e cancro. In particolare, il processo di degradazione-fosforilazione della β-catenina è spesso perturbato nel cancro del colon-retto ed anche in altri tumori e questo risulta in una segnalazione di WNT/β-catenina costitutivamente attiva.

## Recettore Notch

La via di segnalazione di **Notch**, da un punto di vista evolutivo, è altamente conservata negli organismi pluricellulari; interviene nel controllo della determinazione del destino cellulare nel corso dello sviluppo embrionale di moltissimi organi nonché nel mantenimento dell'omeostasi tissutale nell'adulto. Nei mammiferi sono presenti quattro **recettori transmembrana Notch** (Notch 1-4) e cinque ligandi canonici, anch'essi proteine transmembrana, della famiglia **Delta-like** (**DLL1**, **DLL3** e **DLL4**) e **Jagged** (**JAG1** e **JAG2**). È interessante sottolineare che, contrariamente alla maggior parte delle vie di "signaling", che sfruttano molecole diffusibili a breve-media distanza, la via di Notch è una via di segnalazione cellula-cellula, definita di tipo juxtacrino. Il recettore Notch si attiva, infatti, proprio in seguito all'interazione di cellule accostate l'una all'altra, in cui una esprime Notch e l'altra il suo ligando. Il recettore Notch è un eterodimero transmembrana costituito da un ampio dominio extracellulare ed una più corta porzione intracellulare che può essere rilasciata per produrre il dominio intracellulare di Notch (NICD). La peculiarità di questo recettore è la sua doppia funzione: recettore transmembrana e fattore di trascrizione. Il recettore Notch, espresso dalla cellula ricevente il segnale, viene attivato in seguito al legame con un ligando di Notch espresso da una cellula che invia il segnale: questo legame induce la rimozione proteolitica della porzione extracellulare di Notch (NECD) per azione di una ADAM metalloproteasi e la sua trans-endocitosi nella cellula esprimente il li-

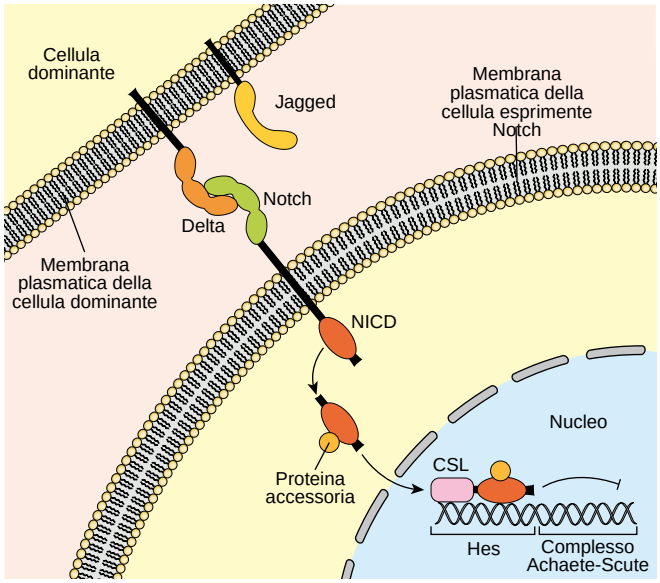



**Figura 2-11** ■ La via canonica di segnalazione Delta/Jagged-Notch. Il recettore Notch viene attivato in seguito al legame con il proprio ligando Delta/Jagged espresso sulla membrana di una cellula dominante. Conseguentemente all'attivazione recettoriale, la γ-secretasi rilascia il dominio intracellulare di Notch, il frammento NICD. Il peptide NICD, si complessa ad una o più proteine accessorie, e quindi trasloca al nucleo dove si associa al fattore di trascrizione CSL e regola l'espressione dei geni bersaglio di Notch, tra cui i repressori trascrizionali HES (che inibiranno a sua volta l'espressione di alcuni geni del complesso Archaete-Scute responsabili del differenziamento dei neuroni).

gando; nella cellula ricevente il segnale, la γ-secretasi rilascia il dominio intracellulare di Notch (NICD) che quindi trasloca al nucleo dove si associa al fattore di trascrizione CSL (CBF1/Suppressor of Hairless/LAG-1) e attiva la trascrizione in parallelo dei geni bersaglio di Notch (*Myc*, *p21*, geni della famiglia Hes (hairy and enhancer of split), che codificano per repressori trascrizionali, cicline D1 e D3, Snail) (Fig. 2-11). Questa semplice via di segnalazione potrebbe essere modificata attraverso differenti meccanismi, da un crescente numero di proteine accessorie che influenzano vari stadi del processo di trasduzione e contribuiscono a creare diversità nel segnale. Per esempio, l'equilibrato processo di sviluppo tra gliogenesi e neurogenesi, che regola la formazione del corretto numero di cellule gliali e di neuroni, è proprio dovuto all'azione del recettore Notch. Nello sviluppo del cervello, infatti, un neurone differenziante che esprime il ligando di Notch e che si trova all'interno di una popolazione di cellule inizialmente equivalenti, diviene una cellula dominante che trasmette alle cellule contigue (che esprimono il recettore di Notch) un segnale che previene il loro differenziamento in cellule dominanti (neuroni). Nelle cellule che esprimono Notch sarà attivata la trascrizione del repressore trascrizionale HES che inibirà l'espressione di alcuni geni del complesso Archaete-Scute, la cui funzione è quella di promuovere lo sviluppo dei neuroni. In questo processo cosiddetto di **inibizione laterale**, le cellule che esprimono Notch saranno inibite a differenziare in neuroni e seguiranno un processo di sviluppo secondario che le porterà a differenziare in cellule gliali.

### Famiglia del fattore di crescita dei fibroblasti

Il **fattore di crescita dei fibroblasti (FGF)** è stato inizialmente scoperto come una sostanza in grado di stimolare la proliferazione dei fibroblasti in coltura. Ad oggi, la famiglia dell'FGF consiste di 22 membri, ognuno dei quali presenta funzioni distinte. È stato infatti riportato che i diversi FGF regolano un'ampia e complessa varietà di azioni biologiche nello sviluppo embrionale, nell'angiogenesi, nella riparazione delle ferite e rigenerazione del nervo, nell'infiammazione cronica e nel cancro. Tutti i processi biologici regolati dai FGF richiedono un controllo spazio-temporale delle differenti risposte cellulari tra cui la proliferazione, invasione, migrazione e differenziamento. I differenti membri della famiglia condividono un 30-50% di omologia di sequenza aminoacidica, presentano due residui di cisteina conservati e si legano ad alta affinità con l'eparina. Tutte le funzioni biologiche dei FGF sono mediate dall'interazione con i loro recettori specifici, i recettori dei FGF ad attività **tirosino-chinasica** (**FGF-R**). Sono presenti quattro recettori per i differenti FGF (FGF-R1/4) che consistono di tre domini extracellulari immunoglobulinici, un singolo dominio transmembrana e una coda citoplasmatica con attività tirosina-chinasica. A differenza di altri fattori di crescita, gli FGF funzionano in concerto con l'eparina o l'eparan solfato per l'attivazione dei recettori. Il legame dell'FGF e dell'eparina al dominio extracellulare del recettore FGF-R ne induce dimerizzazione, attivazione e autofosforilazione di residui multipli di tirosina nel tratto citoplasmatico del recettore. Questi residui fosforilati vengono quindi legati in modo specifico da una serie di proteine di trasduzione del segnale intracellulare (Fig. 2-12) che innescano differenti risposte biologiche.

## MOLECOLE ADESIVE E MOVIMENTI CELLULARI

Da una piccola massa sferica di cellule la forma dell'embrione viene lentamente modellata come dalle mani di uno scultore che lo allunga, lo ripiega, definisce abbozzi

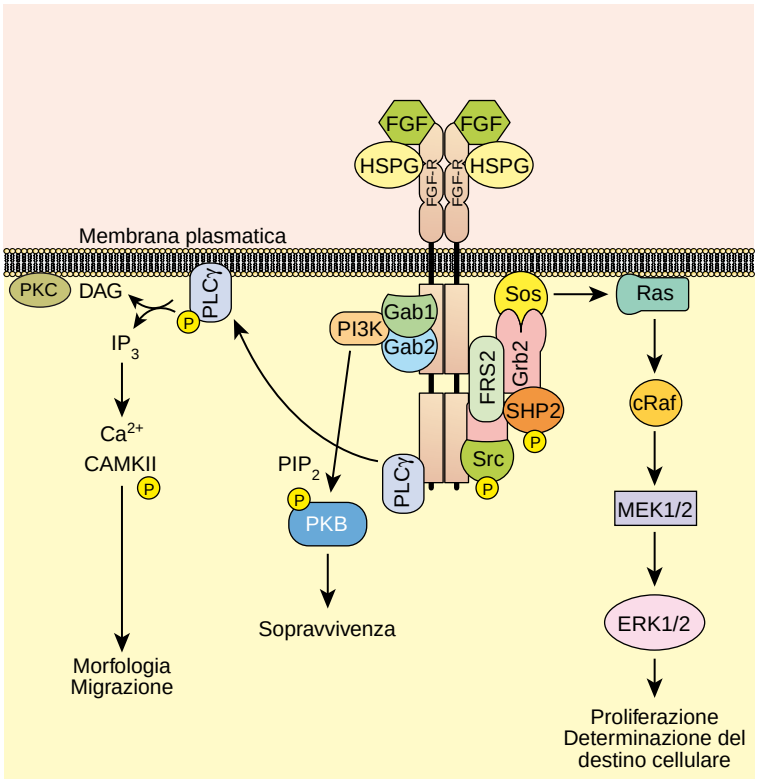



**Figura 2-12** ■ Rappresentazione schematica del meccanismo di trasduzione del segnale dei fattori FGF. La via di segnalazione dell'FGF è inizialmente scatenata dalla dimerizzazione del recettore dell'FGF (FGF-R) conseguente al legame con il ligando FGF. L'interazione FGF-FGF-R induce la fosforilazione incrociata di residui di tirosina nel dominio intracellulare del recettore ad attività tirosino-chinasica. Questi residui fosforilati vengono quindi legati in modo specifico da una serie di proteine della trasduzione del segnale intracellulare quali: PLCγ, FRS2, e membri della famiglia Src. Queste proteine traduttrici sono a loro volta responsabili dell'inizio di differenti vie di "signaling" intracellulare che evocano differenti risposte cellulari: la via della PLCγ; la via della PI3K/PKB; e la via di Ras/ERK. HSPG: Eparina/eparan solfato.

di piccoli organi compatti o cavi, strutture tubulari o sferiche, cavità interne e superfici esterne. Mentre viene modellato, il corpo dell'embrione si accresce fino a raggiungere le sue corrette dimensioni. In questi straordinari processi morfogenici che definiscono la struttura degli organi funzionali, ma anche le diverse sembianze del nuovo individuo, svolgono un ruolo fondamentale i meccanismi di adesione e di movimento cellulare. Strettamente correlati tra loro, questi processi si basano sulle proprietà chimico-fisiche del plasmalemma e del citosol, sui filamenti del citoscheletro e le numerose molecole ad esso associate nonché su segnalazioni da parte di fattori di crescita.

## Famiglie di molecole adesive

Le molecole adesive sono di norma delle proteine intrinseche del plasmalemma in grado di generare forze di attrazione molecolare più o meno stabili, in genere legami chimici non covalenti, quando vengono a contatto con altre proteine dello stesso tipo (**adesione omofilica**) o di tipo diverso (**adesione eterofilica**). Esse possono mediare l'adesione sia tra cellule (**adesione cellula-cellula**) che tra cellula e molecole della matrice extracellulare (**adesione cellula-matrice**). Una cellula in genere possiede diversi tipi di molecole adesive ed è in grado di modificare il tipo di molecole adesive che esprime e/o le proprietà adesive di una certa molecola a seconda dell'ambiente in cui si trova e delle necessità. Le principali classi di molecole adesive che mediano l'adesione cellula-cellula sono quattro: le **caderine**, le **selettine**, alcuni membri della famiglia delle **integrine** (LFA-1, MAC-1), la cui capacità adesiva dipende dagli ioni $Ca^{2+}$ e la **superfamiglia delle molecole adesive immunoglobuline-simili** (ICAM) e le **claudine** e **occludine** che mediano un'adesione indipendente dal $Ca^{2+}$. Le adesioni cellula-matrice sono mediate invece principalmente dai membri **VLA** (very late antigen) della famiglia delle **integrine** che pure necessitano di ioni $Ca^{2+}$ (Tab. 2-5) (Fig. 2-13). La trattazione dettagliata della struttura e delle caratteristiche di queste molecole esula dalle finalità di questo libro. Qui giova riportare che l'adesione delle cellule mediata da queste molecole regola non solamente la posizione e il movimento delle cellule, ma è in grado di regolare diverse altre loro attività che includono la proliferazione, la sopravvivenza e perfino il differenziamento. Difatti tutte le molecole adesive nel versante citoplasmatico sono legate, a volte tramite diverse proteine intermedie, a proteine del citoscheletro e a proteine di segnalazione che a seguito del legame della proteina adesiva vanno incontro a modificazioni. Queste possono avviare segnalazioni che attivano e/o reprimono vie molecolari nel citoplasma e/o che vengono trasmesse al nucleo dove stimolano o inibiscono l'espressione di specifici geni (Fig. 2-14).

## Movimenti cellulari

Nel corso dello sviluppo embrionale gruppi di cellule si muovono singolarmente per raggiungere la sede finale del loro differenziamento o unite insieme per determi-

**TABELLA 2-5**
Molecole dell'adesione cellulare

| Famiglia | Membri della famiglia | Recettori |
|---|---|---|
| **Adesione cellula-cellula** | | |
| Caderine | E-caderina, P-caderina, N-caderina, desmocolline e desmogleine | Lo stesso tipo di caderina |
| Selettine | E-selletina, P-selettina, L-selettina | Oligosaccaridi |
| Superfamiglia delle molecole adesive immunoglobuline-simili (ICAM) | LFA2, LFA3, ICAM, PECAM, V-CAM, N-CAM, Nefrina, JAM | Altre proteine della stessa famiglia, integrine |
| Integrine | LFA-1, MAC-1, altre | ICAM, caderine |
| Claudine e occludine | Claudina1,25, occludina II, III, 1B | Altre proteine della stessa famiglia |
| **Adesione cellula-matrice** | | |
| Integrine | VLA-1,6, MAC-1 | Molecole della matrice extracellulare |

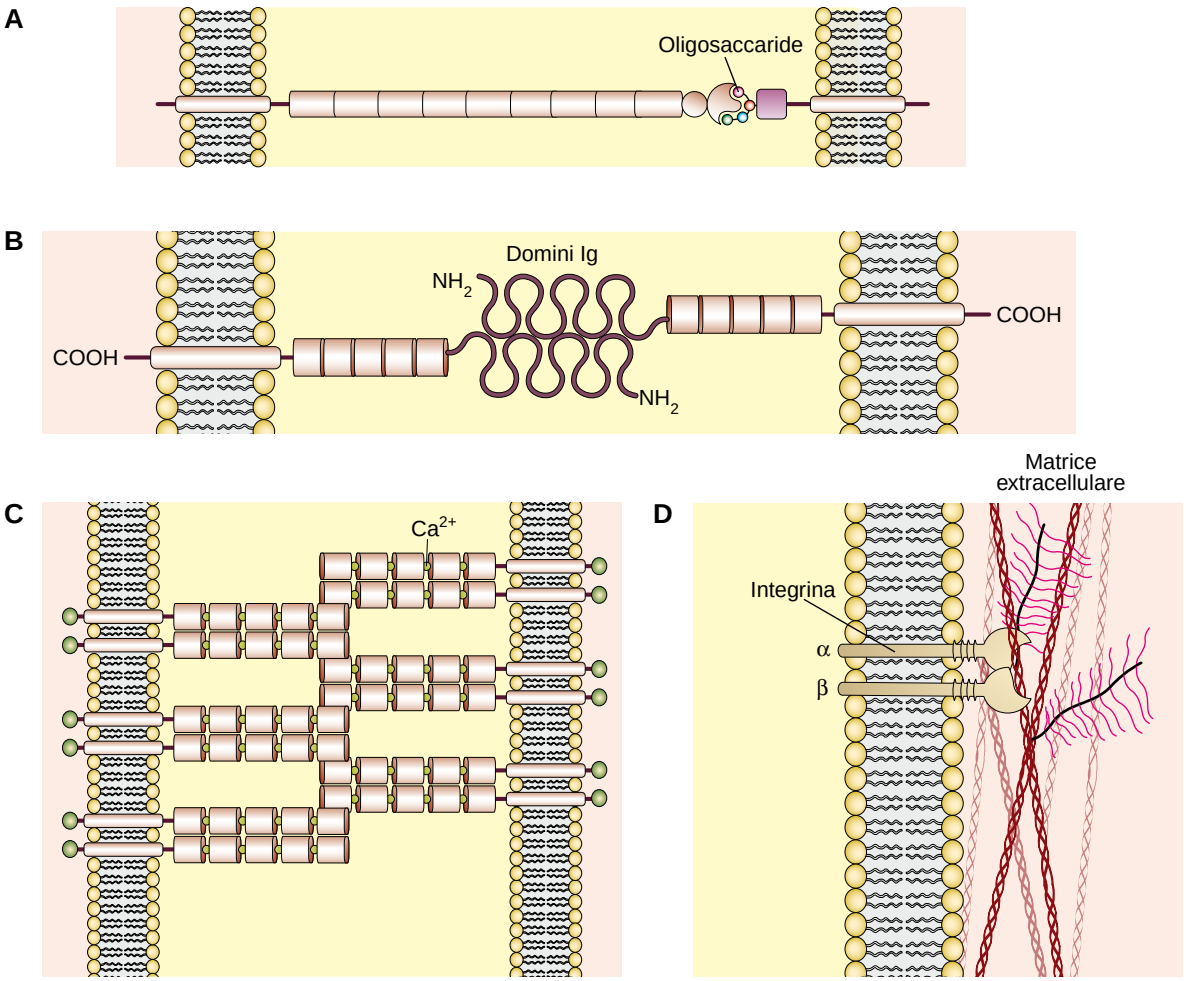



**FIGURA 2-13** ■ I principali tipi di molecole adesive. *A)*Selettina, *B)* ICAM, *C*) Caderina, *E)* Integrina.

nare la struttura e forma di un organo. Per spiegare come possano realizzarsi questi movimenti descriveremo a titolo esemplificativo due esempi che riguardano la migrazione delle cellule germinali primordiali nelle creste gonadiche e la formazione del tubo neurale. Il primo esempio riguarda cellule che si spostano singolarmente, il secondo cellule che si muovono unite in una lamina epiteliale.

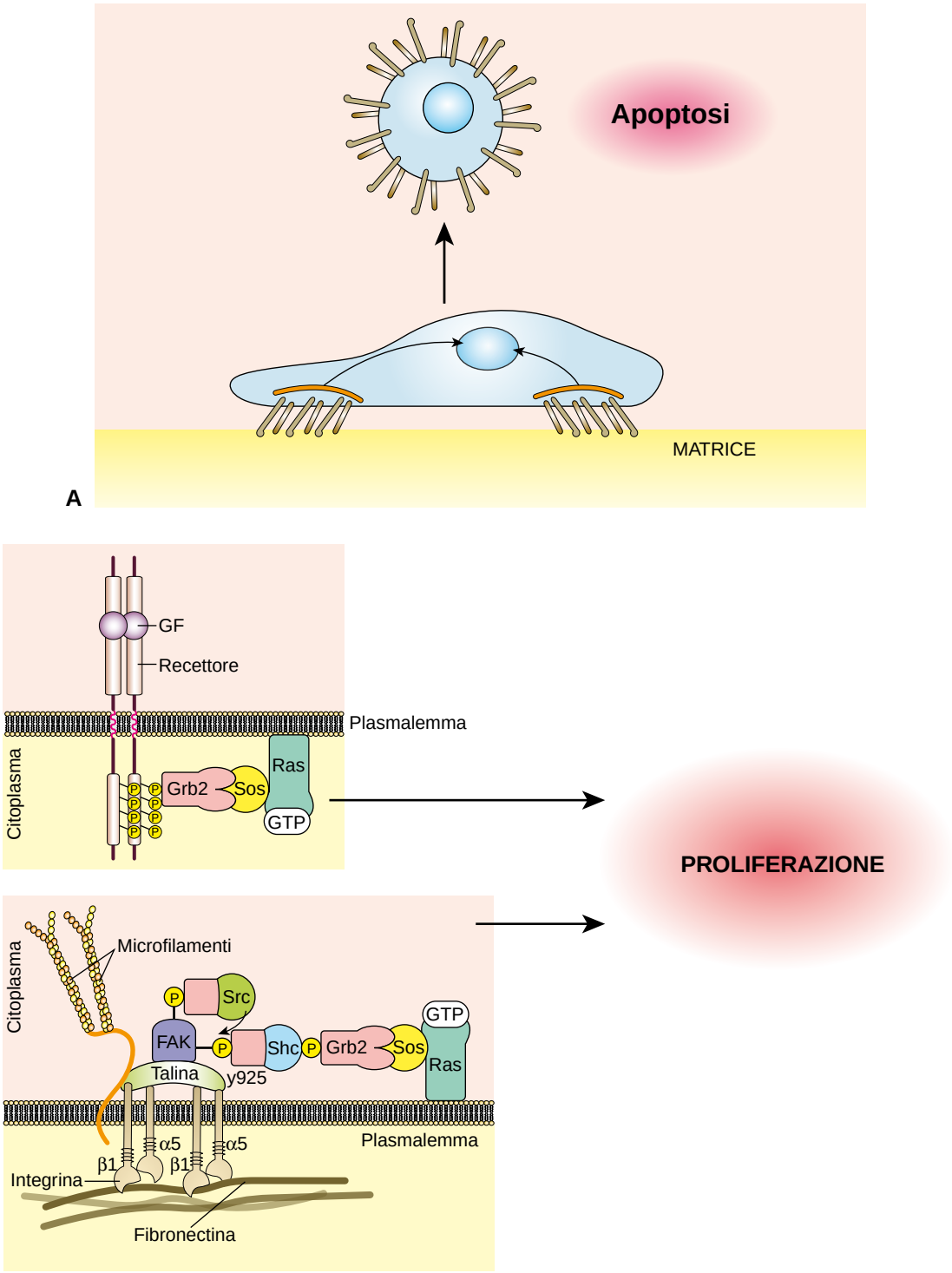



**FIGURA 2-14** ■ Esempi di due attività funzionali di una cellula controllate da molecole adesive. *A)* L'adesione ad un substrato consente alla cellula di sopravvivere, al distacco si attivano vie di morte cellulare che portano la cellula a degenerare per apoptosi. *B)* Due segnali, uno mediato da un fattore di crescita (GF) e l'altro da una integrina convergono su RAS-GTP per stimolare la cellula a proliferare attivando cicline e CDK che promuovono il passaggio dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare.

## La migrazione delle cellule germinali primordiali

Come descriveremo nel Capitolo 16, le cellule germinali non originano nelle gonadi, ma vengono precocemente segregate al di fuori dell'embrione come cellule germinali primordiali (PGC, primordial germ cells) nella parete del sacco vitellino; da qui si muovono per raggiun-

gere le creste gonadiche in formazione all'interno dell'embrione. In una prima fase le PGC, seguendo passivamente i movimenti della parete del sacco vitellino, vengono incorporate all'interno dell'embrione e si ritrovano nella parete dell'intestino posteriore. A distanza di alcune decine di microns a destra e a sinistra di questa, in una piccola regione della parete del celoma, si stanno abbozzando le creste gonadiche. Queste rilasciano delle molecole, probabilmente delle citochine come SDF-1 (stroma derived factor 1) e SCF (stem cell factor) che in modo paracrino stimolano le PGC ad assumere un fenotipo mobile e le attraggono verso le creste. Si tratta di un processo di **chemiotassi** in cui le citochine legandosi a recettori sul plasmalemma delle cellule bersaglio, generano dei segnali che ne modificano il citoscheletro in modo tale che la cellula emette delle protrusioni specializzate chiamate, a seconda della forma e delle loro caratteristiche strutturali e molecolari, pseudopodi, filopodi e lamillipodi. Utilizzando queste protrusioni nelle quali si concentrano molecole adesive, le cellule cominciano a spostarsi interagiscono con cellule vicine e/o con molecole della matrice extracellulare generando forze di adesione dinamica (attacco e distacco) che, con l'intervento del citoscheletro, in particolare dei microfilamenti, ne permettono lo spostamento. Questo avviene in modo direzionale verso la fonte delle citochine che lo hanno attivato, ovvero seguendo un gradiente di concentrazione. In alcune specie, dove i meccanismi molecolari della migrazione delle PGC sono meglio conosciuti, si è visto che quando le PGC cominciano a migrare le cellule circostanti esprimono sulla loro membrana proteine "repellenti" che allontanano le PGC. Spinte quindi da forze di attrazione e repulsione, lasciata la parete dell'intestino, le PGC risalgono il mesentere dorsale e dopo essersi divise in due gruppi si dirigono versa la cresta gonadica di destra o di sinistra. Lungo il loro percorso migratorio esse esprimono sia alcune integrine sia

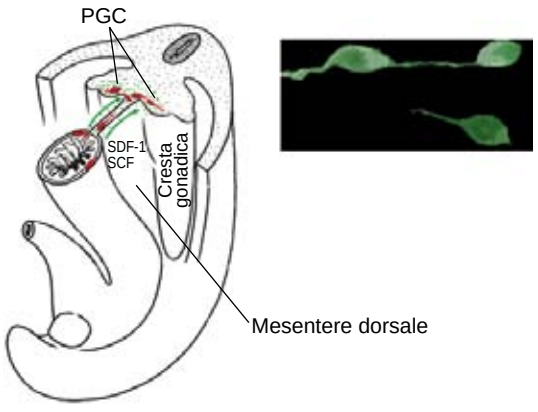



**Figura 2-15** ■ Migrazione delle PGC. Segnali chemiotattici (SDF-1 e SCF) rilasciati dalle creste gonadiche stimolano la motilità delle PGC e ne dirigono i movimenti verso di esse attraverso il mesentere dorsale. Nel riquadro alcune PGC in migrazione, osservare la forma delle cellule con prolungamenti tipici di cellule in movimento.

molecole di adesione cellula-cellula, come la E-caderina, che ne favoriscono il corretto spostamento. Raggiunta la gonade, a seguito di processi non ancora chiariti, le PGC perdono la capacità di movimento e modificano il repertorio e/o le proprietà delle loro molecole adesive in modo tale da divenire cellule stazionarie e da favorire l'adesione tra loro piuttosto che alle cellule circostanti o alle molecole della matrice (Fig. 2-15).

## Formazione del tubo neurale

Come studieremo nel Capitolo 13, la regione anteriore e mediana del tubo neurale (neuroectoderma) si forma da una lamina di cellule dell'ectoderma a seguito di complessi movimenti di queste cellule. Questo processo è chiamato neurulazione primaria, per distinguerlo dalla neurulazione secondaria, che con diverse modalità porterà alla formazione della regione posteriore del tubo neurale. Forze intrinseche ed estrinseche guidano la neurulazione primaria. Le prime includono cambiamenti di forma, spostamenti e proliferazione delle cellule all'interno dell'ectoderma neurale. Le seconde comprendono processi simili, ma a carico delle cellule dell'ectoderma circostante non neurale destinate a formare l'epidermide (epiectoderma) (Fig. 2-16).

Il primo evento che si osserva nelle cellule che sono destinate a diventare neuroectoderma è un cambiamento di forma da cubica a cilindrica. La regione dell'ectoderma che va incontro a questi cambiamenti è chiamata placca neurale (circa il 50% del disco ectodermico). La placca si allunga quindi cranialmente e caudalmente e si restringe per movimenti intrinseci delle cellule che la compongono chiamati **estensione convergente** (Fig. 2-16) e dell'ectoderma circostante. Allo stesso tempo avviene una proliferazione delle cellule della placca preferenzialmente in direzione craniale e caudale che coinvolge Dishevelled (DVL), una proteina nella via di segnalazione di WNT. Le cellule nella linea mediana della placca aderiscono alle cellule della notocorda sottostante ed assumono una forma a cuneo formando la cosiddetta **cerniera mediana** (Fig. 2-16). Questo processo è indotto dal fattore di crescita Sonic Hedgehog (SHH) secreto dalla notocorda.

I cambiamenti di forma delle cellule nella placca e nella cerniera mediana dipendono in parte da modificazioni del citoscheletro, in particolare dei microtubuli e dei microfilamenti, causate da segnalazione di GF e da contatti adesivi. Come descriveremo nel Capitolo 13, la formazione della placca neurale comporta l'inibizione dei segnali di BMP4 e WNT; in assenza di questi le cellule ectodermiche destinate a diventare neuroectoderma riorganizzano il loro citoscheletro. In animali da esperimento, due geni *p190RhoGAP*, che codifica per una RHO-GTPasi, e *Shroom*, che codifica per una "actin binding protein", sono stati identificati svolgere un ruolo cruciale per la formazione della cerniera mediana; il tubo neurale non si forma in assenza o a seguito di mutazioni di questi geni.

Le numerose mitosi che si verificano nelle cellule del neuroectoderma contribuiscono alle modificazioni di forma a seguito di un curioso fenomeno chiamato **mi-**

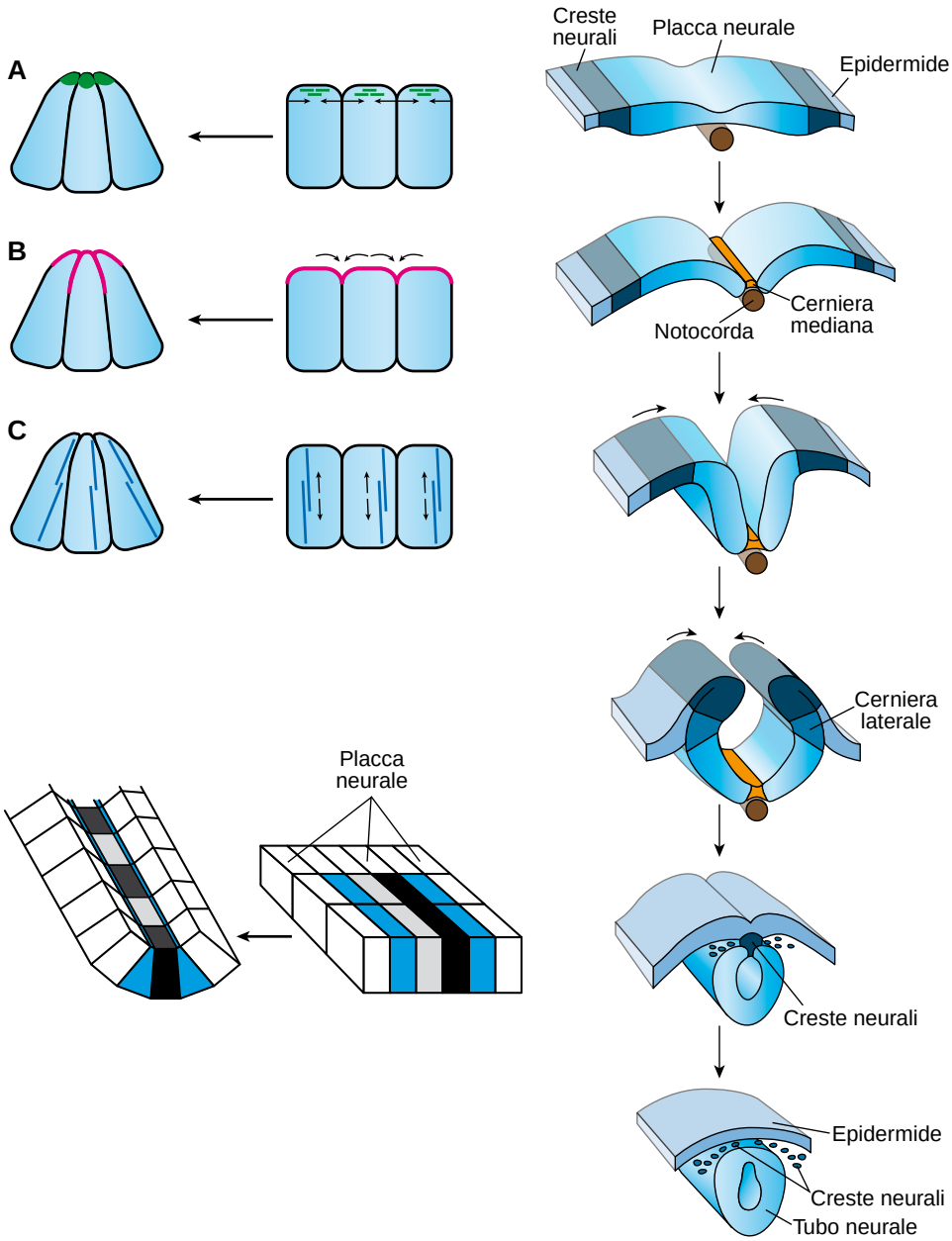



**FIGURA 2-16** ■ Movimenti morfogenici nella formazione del tubo neurale. A destra, le diverse fasi in cui sono messe in evidenza le cerniere di rotazione. A sinistra in alto (*A,B,C*), cambiamenti della forma delle cellule causati da modificazioni del citoscheletro fanno assumere una forma a cuneo alle cellule nelle regioni delle cerniere; in basso, estensione convergente delle cellule neuroectodermiche. Notare come le cellule in grigio "slittino" tra le cellule in nero, contribuendo all'allungamento ed al restringimento della placca neurale.

**grazione intercinetica dei nuclei** (Fig. 2-17). Nelle cellule in rapida mitosi i nuclei si spostano nella regione apicale causando un allargamento della cellula che precede la citodieresi. Nelle cellule cuneiformi il ciclo cellulare è rallentato e i nuclei rimangono più a lungo alla base della cellula che si allarga.

L'estensione convergente delle cellule del neuroectoderma che contribuisce all'allungamento e al restringimento della placca avviene per movimenti di slittamento tra le cellule le cui basi molecolari non sono state ancora chiarite; la formazione di lamellipodi è stata, tuttavia, descritta come un evento importante in questo movimento.

I margini laterali della placca vengono spinti verso il centro dalla crescita delle cellule ectodermiche e mesodermiche sottostanti; queste ultime producono acido ialuronico che favorisce le forze di spinta. La placca immobilizzata a livello della cerniera mediana inizia a

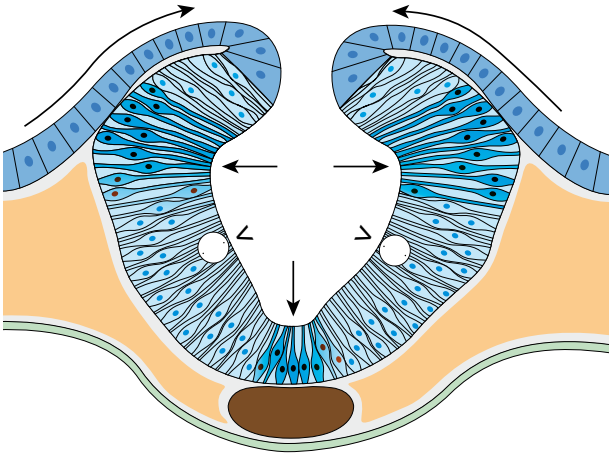


**Figura 2-17** ■ Disegno schematico della forma delle cellule nella parete del tubo neurale: notare le regioni delle cerniere (frecce) e la migrazione intercinetica dei nuclei (punte di freccia)

formare una depressione, la doccia neurale. Nella regione di confine tra i margini laterali della doccia (creste neurali) destinati a dare origine alle creste neurali e la regione ventrale della doccia, le cellule assumono una forma a cuneo formando due **cerniere laterali** una a destra ed una a sinistra. La continua spinta dell'ectoderma circostante provoca un ripiegamento del neuroectoderma intorno a queste due cerniere portando i margini laterali della doccia a contatto lungo la linea mediana. Nelle regioni di contatto le cellule emettono delle estroflessioni digitiformi e secernono grandi quantità di oligosaccaridi che costituiscono una colla adesiva per le selettine. Da notare che le cerniere laterali non si formano nella regione del midollo spinale del tubo neurale dove i margini laterali della doccia sono molto vicini ed è sufficiente la cerniera mediana per portarli a contatto.

La separazione del tubo neurale dall'ectoderma circostante avviene per l'espressione di molecole adesive diverse, N-CAM e N-caderina nel neuroectoderma ed E-caderina nelle cellule epiteliali. Le cellule delle **creste neurali** cessano quindi di esprimere molecole adesive cellula-cellula e si staccano dal tubo neurale e dall'epitelio iniziando a migrare nella matrice extracellulare (processo di **transizione epitelio-mesenchimale** (EMT); vedi Capitolo 10).

## Letture consigliate

Andersson ER, Sandberg R, Lendahl U. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. Development 138, 3593-3612, 2011.

Brown K; Yamada K. The role of integrins during vertebrae development. Developmental Biology 6, 69-77, 1995.

Chothia C, Jones EY: The molecular structure of cell adhesion molecules. Ann Rev Biochem 66, 823-862, 1997.

De Felici M. Primordial germ cells at the beginning of the XXI century. IJDB 53, 891-894, 2009.

Farini D, La Sala G, Tedesco M, De Felici M. Chemoattractant action and molecular signaling pathways of Kit Ligand on mouse primordial germ cells. Dev Biol 306, 572-583, 2007.

Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. Cell 84(3), 345-357, 1996.

Hardy K, Spanos S. Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. Journal of Endocrinology 172, 221-236, 2002.

John B. Wallingford neural tube closure and neural tube defects: studies in animal models reveal known knowns and known unknowns. American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics, Special Issue: Neural Tube Defects Volume 135C, Issue 1, 59-68, 2005.

Pires-Dasilva A, Sommer RJ. The evolution of signalling pathways in animal development. Nature Review Genetics 39, 40-49, 2003.

Reima I. Maintenance of compaction and adherent-type junctions in mouse morula-stage embryos. Cell Differ Dev 29(2), 143-153, 1990.

Sanchez-Amdrid P, Cabanas C, Sanchez-Madrid F. Regulation of integrin function. Sem Cancer Biol 7, 99-109, 1996.

Spitz F, Furlong EEM. Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. Nature Reviews Genetics 13, 613-626, 2012.

Thomas MC, Chiang CM. The general transcription machinery and general cofactors. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 41(3), 105-178, 2006.

Watson AJ, Barcroft LC. Regulation of blastocyst formation. Front Biosci 6, 708-730, 2001.

Whitman M, Melton DA. Growth factors in early embryogenesis. Annual Review of Cell Biology 5, 93-117, 1989.

Willert K, Nusse R. Wnt proteins. Cold Spring Harb Perspect 4:a007864, 2012.

Wu MY, Hill CS. TGF-β superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. Developmental Cell 16, 329-343, 2009.

Zeitlinger J, Stark A. Developmental gene regulation in the era of genomics. Developmental Biology 339, 230-239, 2010.

3

# Generalità dello sviluppo prenatale

Massimo De Felici

Il processo tramite il quale una singola cellula, lo zigote, dà origine ad un individuo formato da più di 100 trilioni di cellule organizzate in tessuti, organi e sistemi, è forse il fenomeno più straordinario che avviene in natura. Il periodo di sviluppo di un nuovo individuo che precede la nascita (**sviluppo prenatale**) dura in media 38 settimane e può essere suddiviso in un primo periodo di divisione dello zigote che comprende la 1ª e la 2ª settimana e che segue la fecondazione (alcuni ricercatori hanno suggerito di chiamare il concepito durante questo periodo **pre-embrione**); un secondo periodo che va dalla 3ª all'8ª settimana, definito **periodo embrionale** (il termine embrione significa "che germoglia dentro"), e un terzo periodo, dalla 9ª alla 38ª settimana, il **periodo fetale** (il termine feto significa "germoglio in gestazione"). Alcuni studiosi considerano periodo embrionale le prime otto settimane, senza separare da queste le prime due (Figg. 3-1 e 3-2).

- **1ª-2ª settimana.** Nelle prime due settimane dopo la fecondazione dall'uovo fecondato o **zigote** si sviluppa prima la **morula** e poi la **blastocisti** che si impianta nella mucosa dell'utero. La blastocisti a termine è formata da circa 120 cellule di cui circa 40 chiamate cellule della **massa cellulare interna** (ICM) sono pluripotenti, ovvero in grado di dare origine a tutti i tessuti del corpo umano, mentre le altre circa 80 cellule che racchiudono l'ICM, chiamate **trofoblasto**, sono in grado di dare origine solamente a tessuti della placenta (vedi Capitolo 9).
- **Periodo embrionale (3ª-8ª settimana).** Nella prima parte del periodo embrionale (3ª-5ª settimana), si formano le **cellule germinali primordiali** (primordial germ cells, PGC). Il **sistema cardio-vascolare** è il primo apparato che inizia a funzionare (21°-22° giorno) ed insieme alla **placenta primitiva** in via di formazione, sopperisce alle necessità metaboliche dell'embrione diventato troppo grande per nutrirsi per semplice diffusione. Il sistema nervoso inizia ad abbozzarsi sottoforma di **placca neurale** intorno alla metà della 3ª settimana. La placca si invagina a formare la **doccia neurale** i cui margini si avvicinano per formare quindi il **tubo neurale**. I **neuropori** che delimitano anteriormente e posteriormente il tubo neurale, si chiudono (25°-28° giorno) ed il tubo neurale viene inglobato all'interno della testa. Le regioni della testa e del collo sono caratterizzate dallo sviluppo degli **archi branchiali**, gli abbozzi pari dei cristallini (**placodi ottici**) al di sopra dei calici ottici, e degli orecchi interni (**placodi otici**), mentre in posizione ventrale protrude un evidente rigonfiamento che contiene l'**abbozzo del cuore**. Nella regione del tronco dorsalmente i **somiti** protrudono al di sotto dell'epiectoderma e dalla regione del collo arrivano fino all'estremità caudale, dove si abbozza una coda. Ventralmente si sviluppa la connessione con la placenta, il **peduncolo ombelicale**, lateralmente si evidenziano gli **abbozzi degli arti superiori** ed **inferiori**.

Durante il periodo embrionale i tre annessi embrionali (**corion**, **amnios** e **sacco vitellino**) vanno in contro a cambiamenti sostanziali che porteranno l'embrione ad essere completamente racchiuso all'interno del **sacco amniotico** trasparente, immerso nel liquido amniotico, e circondato dalla **sfera corionica** o **corion**.

Nella seconda metà del periodo embrionale (6ª-8ª settimana), l'embrione assume un aspetto decisamente umano. Mentre precedentemente l'embrione umano assomiglia a quello degli altri mammiferi, da questo momento in poi, a causa dello sviluppo del cervello, la testa inizia ad assumere dimensioni ragguardevoli, compaiono gli organi genitali interni, le estremità si allungano e si sviluppano le dita. Gli archi faringei si modellano con i processi della faccia in una testa di forma umana, la segmentazione dei somiti non è più visibile e la coda viene riassorbita.

Durante l'8ª settimana, la sfera corionica perde la maggior parte dei villi, prima uniformemente distribuiti sulla sua superficie. I villi permangono e continuano a svilupparsi solamente nella regione del corion chiamata **corion frondoso** dove inizia ad or-

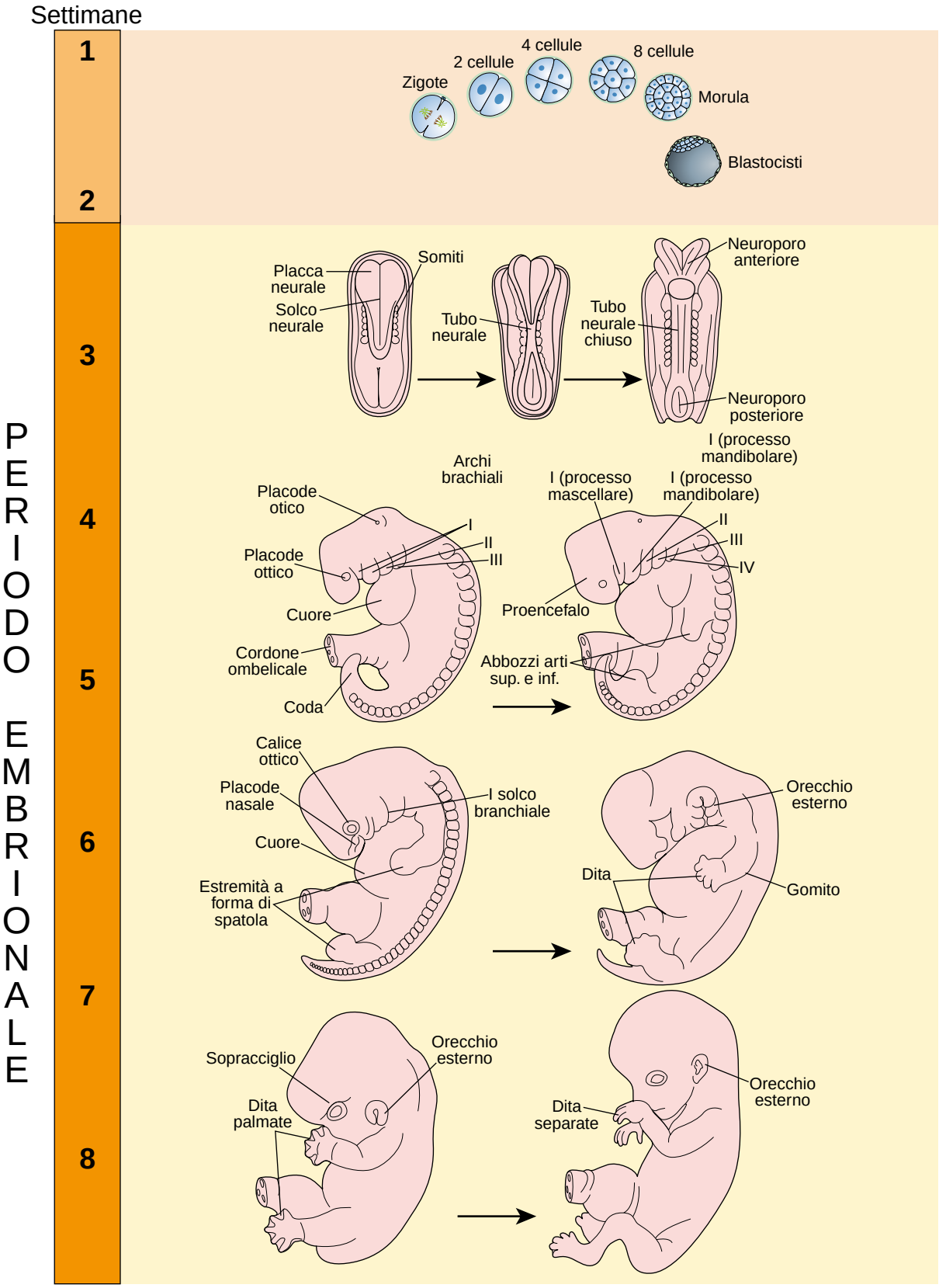



**Figura 3-1** ■ Stadi dello sviluppo embrionale dalla 1ª alla 8ª settimana.

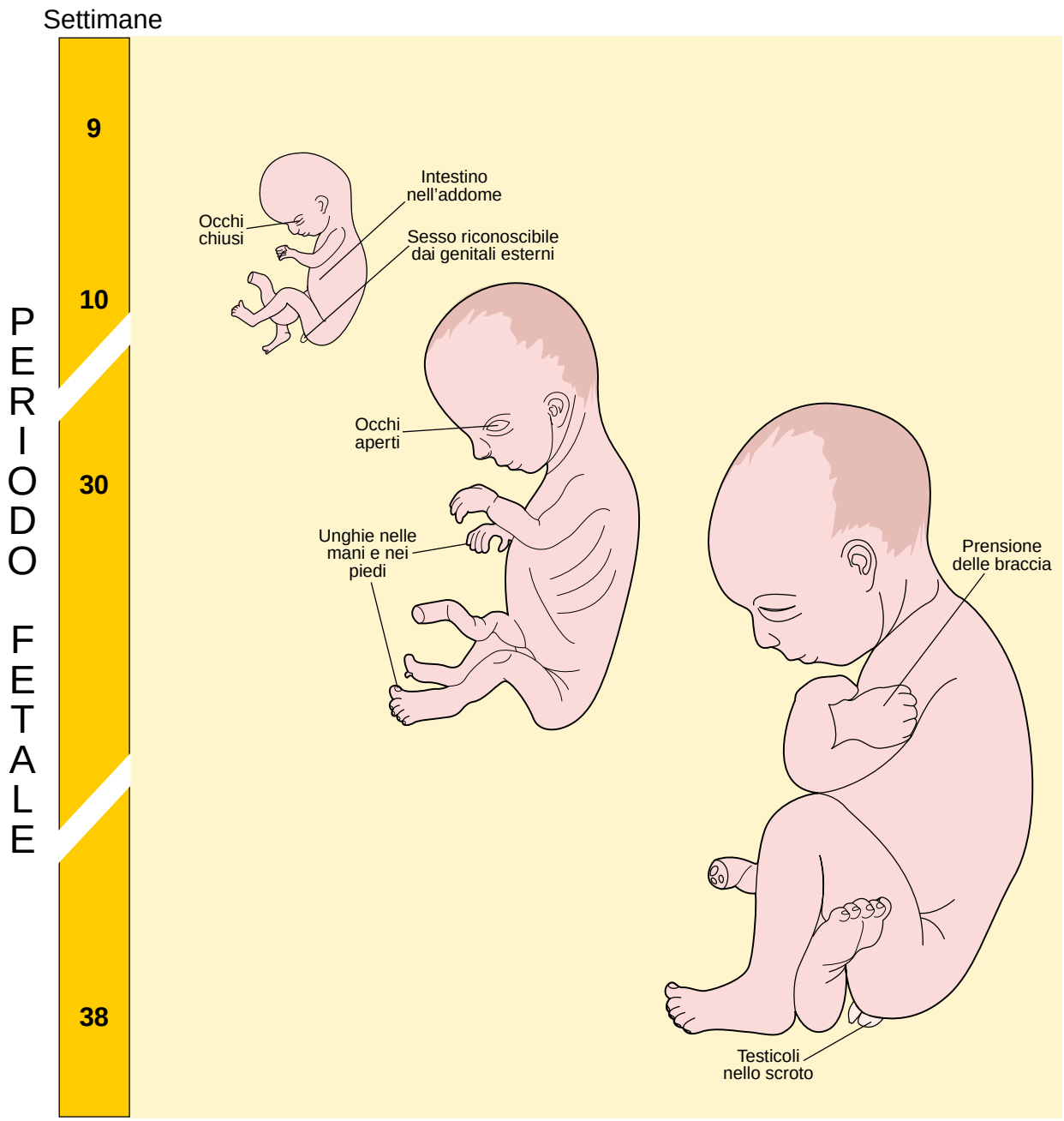



**FIGURA 3-2** ■ Stadi dello sviluppo fetale dalla 9ª alla 38ª settimana.

ganizzarsi la componente fetale della placenta definitiva.

Alla fine del periodo embrionale la maggior parte degli organi è abbozzata. L'embrione pesa circa 1 g ed è lungo circa 3 cm (distanza CRL = lunghezza cranio-caudale). L'epidermide che lo riveste è ancora un sottile tessuto trasparente che permette di intravedere gli organi interni dell'embrione.

■ **Periodo fetale (9ª-38ª settimana).** Il periodo fetale occupa gli ultimi sette mesi ed è un periodo di accrescimento, riposizionamento e differenziamento di organi già abbozzati che progressivamente si organizzano in sistemi funzionanti.

Alla fine del terzo mese nella maggior parte delle ossa sono presenti i **centri di ossificazione primari**, si differenziano le **dita** delle mani e dei piedi e i **genitali esterni** iniziano a mostrare segni di differenziamento sessuale. Verso la fine del 3° mese, la respirazione fetale, intesa come scambio di ossigeno ed anidride carbonica dal sangue materno ai tessuti fetali e viceversa

sa, avviene a livello della **placenta definitiva** e continua per tutta la vita intrauterina. I polmoni, difatti, restano inattivi fino al momento della nascita; come sopra riportato, infatti, l'embrione è racchiuso nel sacco amniotico pieno di liquido e le sue vie aeree sono ripiene del liquido stesso. Il feto respira dunque non mediante i polmoni, ma in modo indiretto, scambiando gas respiratori con il sangue della madre mediante la placenta.

Dopo il quarto mese il feto è lungo in media 15 cm e pesa circa 110 g, il sesso è facilmente identificabile dai genitali esterni, la faccia ha aspetto umano e in genere si notano dei movimenti. Durante il quinto e il sesto mese, l'epidermide si opacizza per lo sviluppo di un rivestimento peloso, detto **lanugine**. Le dimensioni del corpo cominciano a essere proporzionate rispetto a quelle della testa. Durante il settimo mese la pelle, ora rossa e rugosa, è coperta da una sostanza protettiva bianca, chiamata **vernice caseosa**, costituita da una miscela di cellule epiteliali, peli di lanugine e secrezioni delle ghiandole della pelle. A quest'età il feto è lungo circa 40 cm e pesa più di 1 kg. Gli organi del corpo sono sufficientemente sviluppati da permettere la vita al di fuori dell'utero; gli ultimi due mesi di gravidanza servono, tuttavia, a raggiungere uno stadio di sviluppo tale per cui aumentano le probabilità di sopravvivenza extrauterina. Durante l'ottavo e il nono mese, il feto perde l'aspetto rugoso grazie alla deposizione di grasso sottocutaneo e le dita delle mani e dei piedi presentano unghie ben sviluppate. Alla fine del periodo fetale, il feto pesa in media 3 kg ed è lungo 50 cm.

## PROCESSI E MOLECOLE

Lo sviluppo di un nuovo individuo è controllato dalla corretta espressione temporale e regionale dei geni (**genoma**) disposti sui suoi cromosomi che egli riceve dai genitori. Dal momento che, come spiegato nel Capitolo 9, per ragioni etiche esperimenti non possono essere condotti su embrioni umani, la gran parte delle nostre conoscenze sui processi morfogenici e i meccanismi molecolari che regolano tale complesso processo provengono da studi condotti su modelli sperimentali animali quali il verme *Caenorhabtidis elegans*, il moscerino dell'aceto *Drosophila melanogaster*, gli anfibi, gli uccelli e il topo di laboratorio.

Oltre che dal genoma lo sviluppo embrionale dipende da influenze ambientali che in certa misura sono in grado di modulare l'espressione dei geni. I fattori che per esempio determinano le interazioni tra i tessuti, la migrazione ed il differenziamento delle cellule, la proliferazione di gruppi di cellule, come pure la loro morte per apoptosi programmata sono numerosi. Tra essi ricordiamo i fattori di trascrizione e di crescita, le molecole che mediano l'adesione cellule-cellula e cellula matrice e gli ormoni, di cui abbiamo trattato nel Capitolo 2 e di cui parleremo spesso nei paragrafi dedicati ai processi ed alle molecole. Lo sviluppo embrionale è un processo di crescita e differenziamento in cui l'embrione diventa sempre più complesso man mano che le strutture e le funzioni si moltiplicano. La crescita dipende dalla moltiplicazione per mitosi delle cellule somatiche. Allo scopo di controllare la crescita, sono necessari meccanismi di restrizione in grado di fermare le divisioni cellulari al momento giusto. La complessità delle strutture è connessa con la morfogenesi ed il differenziamento. Uno degli aspetti più affascinanti dello sviluppo embrionale sta nel fatto che da una singola semplice cellula, lo zigote, deriva un organismo che consiste di 100 trilioni di cellule differenziate in circa duecento tipi diversi ed organizzate in tessuti e questi in organi e sistemi. Comprendere come questo si realizzi è lo scopo principale dell'Embriologia.

### *Terminologia descrittiva*

Nel descrivere lo sviluppo prenatale è necessario usare termini che indicano la posizione di una parte rispetto all'altra o all'intero organismo. Per convenzione, l'embrione viene descritto come se fosse a quattro zampe, per cui quello che in Anatomia è superiore in Embriolo-

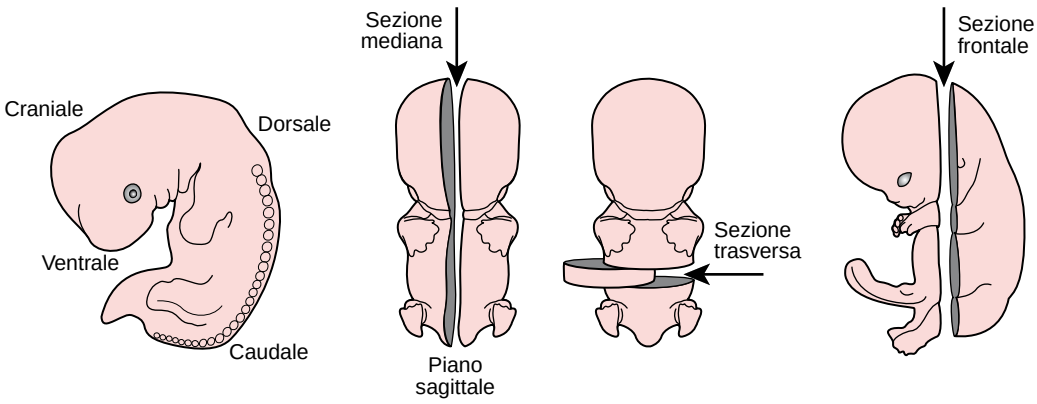



**Figura 3-3** ■ Termini e piani per indicare la posizione di una parte rispetto all'altra o all'intero dell'embrione.

gia è craniale, quello che inferiore è caudale; allo stesso modo quello che in Anatomia è anteriore e posteriore in Embriologia è ventrale e dorsale. Quindi le posizioni delle strutture dell'embrione sono definite dai termini **craniale** (o rostrale) e **caudale**, **dorsale** e **ventrale**. La distanza di una struttura dal suo punto di attacco è indicata con **prossimale** e **distale**. Il **piano mediano** è un piano verticale immaginario che passa attraverso il centro del corpo (attraverso gli assi longitudinale e sagittale), dividendolo in due metà (di destra e di sinistra) uguali o antimeri. Il **piano sagittale** è un piano verticale immaginario parallelo al piano mediano che non passa necessariamente per il centro. Spesso questi due piani vengono considerati come un unico piano chiamato sagittale-mediano. Il **piano frontale** o **coronale** è un piano verticale parallelo alla fronte e perpendicolare al piano mediano (passa per gli assi trasversale e longitudinale), divide il corpo in parte ventrale e dorsale. Il **piano orizzontale** o **trasversale** è un piano che divide il corpo in due metà, craniale e caudale (Fig. 3-3). Attraverso i piani definiti sopra passano le rispettive sezioni.

## *Calcolo dell'età del concepito*

Poiché è difficile determinare il giorno esatto del concepimento, il metodo comunemente usato dai ginecologi per calcolare l'età del concepito è quello di partire dal primo giorno dell'ultima mestruazione (**LMP**, last menstrual period). Questo calcolo assume che la fecondazione sia avvenuta il 14° giorno del ciclo estrale della donna. L'età del concepito in questo caso è chiamata **età gestazionale** e non corrisponde alla sua età reale. Questa ovviamente parte dal giorno della fecondazione e si esprime come giorni o settimane dalla fecondazione. Utilizzando la datazione LMP la durata della gestazione è di 40 settimane (280 giorni) sebbene anche 38 e 42 settimane siano considerate nella norma. In clinica inoltre è molto comune suddividere il periodo gestazionale in tre trimestri. Come sopra ricordato, in realtà a partire dalla fecondazione le settimane di sviluppo sono in media due in meno, ovvero 38.

La determinazione dell'età dell'embrione su base morfologica ed istologica segue le descrizioni effettuate su embrioni abortiti o a seguito di accertamenti medici, quali l'ecografia. Sulla base di questi studi sono stilate delle tabelle di età rapportate alla lunghezza dell'embrione, alle sue caratteristiche morfologiche esterne ed interne. Negli embrioni precoci le indicazioni di lunghezza si riferiscono alla **lunghezza massima** (LM). Dopo la formazione della curvatura cefalica (intorno alla 5ª settimana) la lunghezza maggiore corrisponde alla **lunghezza vertice del cranio-coccige** (CRL o LVC). Alla fine della 4ª settimana, quando l'embrione ha circa 28 somiti, le principali caratteristiche esterne sono i somiti e gli archi faringei. Pertanto in questo periodo, l'età dell'embrione è abitualmente espressa in somiti (Tab. 3-1). Streter (1942) e O'Rally (1987) hanno suddiviso il periodo embrionale in 23 stadi riferendosi ad esemplari della **collezione Carnegie** (Fig. 3-5). Durante il periodo fetale si utilizza anche la **lunghezza vertice-tallone** (CHL) (Fig. 3-4).

**TABELLA 3-1**
Età dell'embrione correlata al numero dei somiti

| Età | N. somiti |
|---|---|
| 20 | 1-4 |
| 21 | 4-7 |
| 22 | 7-10 |
| 23 | 10-13 |
| 24 | 13-17 |
| 25 | 17-20 |
| 26 | 20-23 |
| 27 | 23-26 |
| 28 | 26-29 |
| 29 | 29-34 |
| 30 | 34-35 |

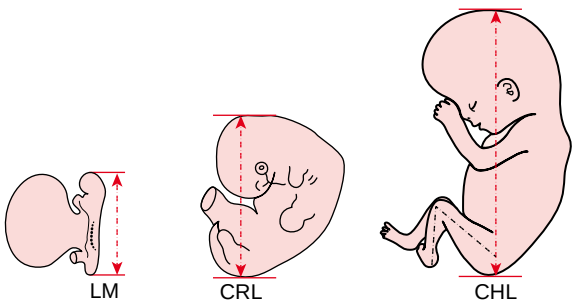
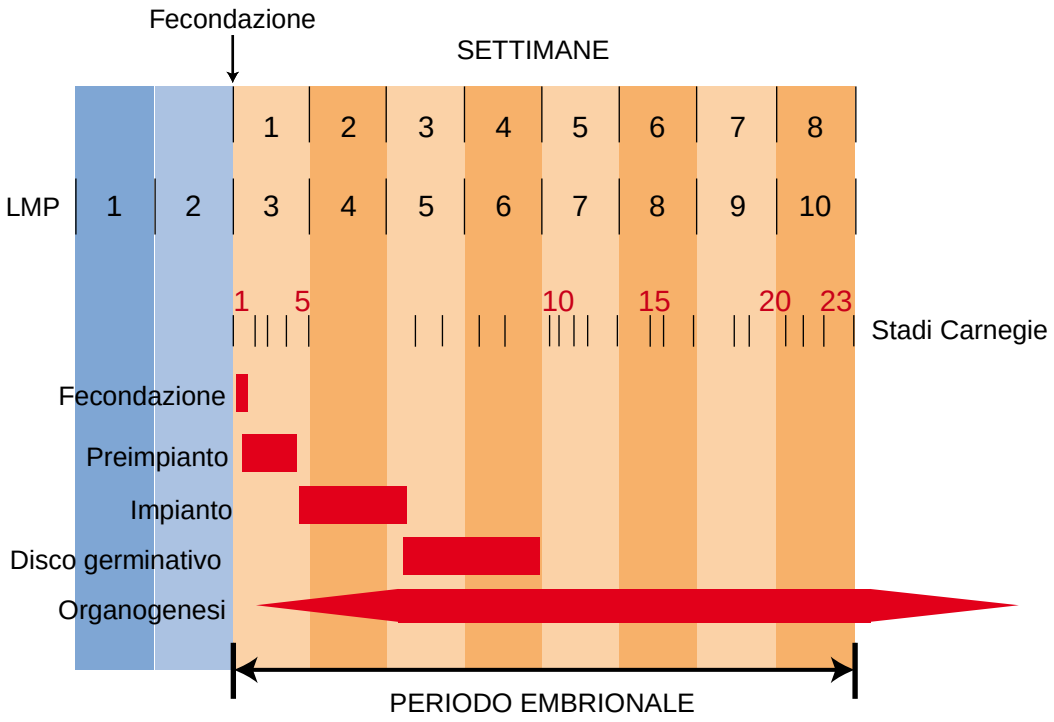


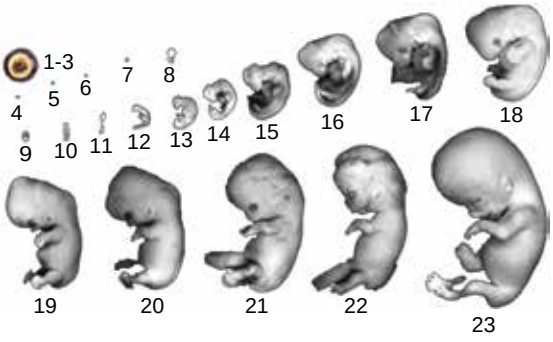

**FIGURA 3-4** ■ Misura della lunghezza dell'embrione a seconda dello stadio di sviluppo. LM = lunghezza massima; CRL = lunghezza cranio-coccige (dai termini inglesi crown-rump), CHL = lunghezza cranio-tallone (dai termini inglesi crown-heel).

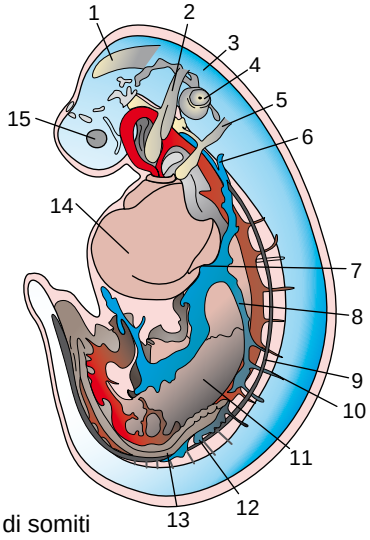
# ASPETTI CLINICI

## *Studio dello sviluppo anormale dell'embrione*

Durante le prime due settimane il concepito è soggetto alla legge del tutto o niente, ovvero qualsiasi anomalia di sviluppo insorga o venga provocata durante questo periodo non causa anormalità postnatali; l'embrione ripara il difetto o muore (aborto spontaneo). Al contrario durante il successivo periodo embrionale (3ª all'8ª settimana), si verificano le principali anomalie di sviluppo che possono causare anormalità postnatali. Durante questo periodo l'embrione è estremamente vulnerabile ad influenze esterne nocive causate da composti definiti **teratogeni**. Difatti molte anomalie congenite compaiono in questo periodo durante il quale le cellule embrionali vanno in contro a numerose divisioni mitotiche. Si stima che più del 90% delle circa 4.500 strutture del corpo umano si abbozzino durante il periodo embrionale. Durante il periodo fetale la sensibilità ai teratogeni è in




**Stadio 12:**
3-5 mm
26-30 giorni
21-29 coppie di somiti

**Figura 3-5** ■ In alto la tabella considera le prime otto settimane di sviluppo a partire dalla fecondazione o le prime dieci considerando l'età gestazionale (LMP). I 23 stadi Carnegie sono indicati in rosso e coprono le prime otto settimane. In basso *la* morfologia di embrioni dallo stadio 1-23 Carnegie; a destra un embrione allo stadio 12. 1 = n. trigemino, 2 = n. facciale, 3 = tubo neurale, 4 = vescicola otica, 5 = n. glossofaringeo, 6 = vena cardinale ant., 7 = corno sinistro seno venoso, 8 = vena cardinale inf., 9 = notocorda, 10 = arteria intersegmentale, 11 = intestino; 12 = dotto di Wolff, 13 = mesonefro, 14 = cuore, 15 = vescicole ottica.

generale notevolmente minore in quanto la maggior parte degli organi, ad eccezione della corteccia cerebrale e dello scheletro, è già formata (Figg. 3-6 e 3-7).

Converrà prima di continuare la trattazione di questa sezione definire il significato di alcuni termini utilizzati di frequente nello studio delle anomalie di sviluppo. Un'**anomalia congenita** è un variazione nella forma e/o nella struttura di uno o più organi o tessuti di ogni tipo presente alla nascita. Tuttavia, non tutte le variazioni dello sviluppo sono anomalie patologiche. Le anomalie congenite includono le **malformazioni** di un organo o parti di un organo e le **displasie** che comportano un'organizzazio-

**TABELLA 2**
Sommario del periodo dello sviluppo embrionale

| Giorni dalla fecondazione | CRL (mm) | Stadio Carnegie | Principali caratteristiche esterne |
|---|---|---|---|
| 1-2 | 0,1 | 1 | Zigote |
| 4-6 | | 3 | Blastocisti |
| 6-15 | 0,2-0,5 | 5 | Embrione trilaminare con linea primitiva |
| 20-22 | 1,5-2,0 | 9 | Tubo cardiaco in chiusura |
| 22-24 | 2,0-3,0 | 10 | Tubo neurale in chiusura<br>Il cuore comincia a battere |
| 24-26 | 3,0-4,0 | 11 | Neuroporo anteriore chiuso |
| 26-30 | 4,0-5,0 | 12 | Abbozzi arti superiori |
| 28-32 | 5,0-6,0 | 13 | I, II, III, IV archi branchiali |
| 31-35 | 6,0-7,0 | 14 | Placodi ottici e nasali |
| **Inizio organogenesi** | | | |
| 35-38 | 7,0-10,0 | 15 | Formazione delle mani<br>Pigmento retinico visibile |
| 37-42 | 10,0-12,0 | 16 | Formazione dei piedi |
| 42-44 | 12,0-14,0 | 17 | Raggi delle dita<br>Orecchio esterno |
| 44-48 | 14,0-17,0 | 18 | Si distinguono le dita |
| 48-51 | 16,0-20,0 | 19 | Tronco in allungamento<br>Erniazione dell'intestino |
| 51-53 | 20,0-22,0 | 20 | Dita delle mani distinte, ma unite |
| 53-54 | 20,0-24,0 | 21 | Dita delle mani separate e in allungamento |
| 54-56 | 24,0-28,0 | 22 | Dita dei piedi separate e in allungamento |
| 56-60 | 28,0-30,0 | 2 | Palpebre chiuse<br>Testa arrotondata |

ne anomala di cellule all'interno dei tessuti. Una **sindrome** è un quadro di anomalie multiple ritenute essere patogenicamente correlate, l'**agenesia** è l'assenza di un organo.

Le anomalie congenite possono essere singole o multiple, ereditarie o sporadiche, apparenti o nascoste, grossolane o microscopiche. Quasi la metà delle morti neo-

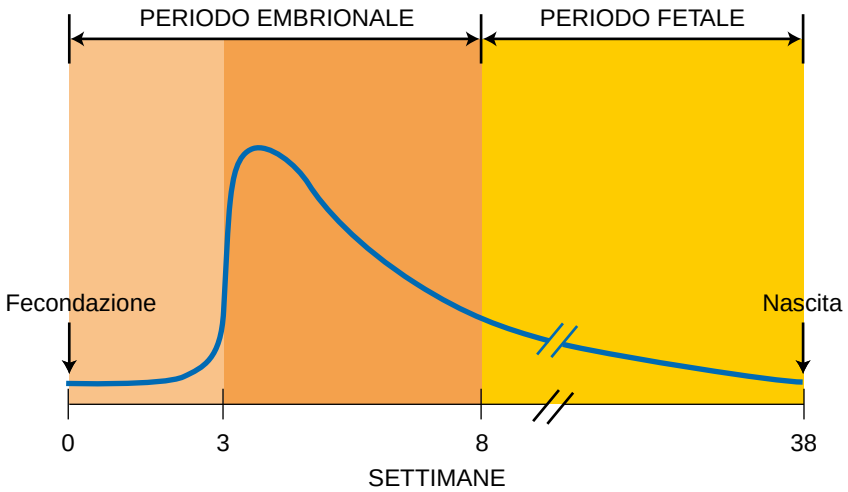



**FIGURA 3-6** ■ Il grafico mostra come la frequenza dell'insorgenza delle anomalie del concepito sia molto alta durante il periodo embrionale e diminuisca sensibilmente nel periodo fetale.

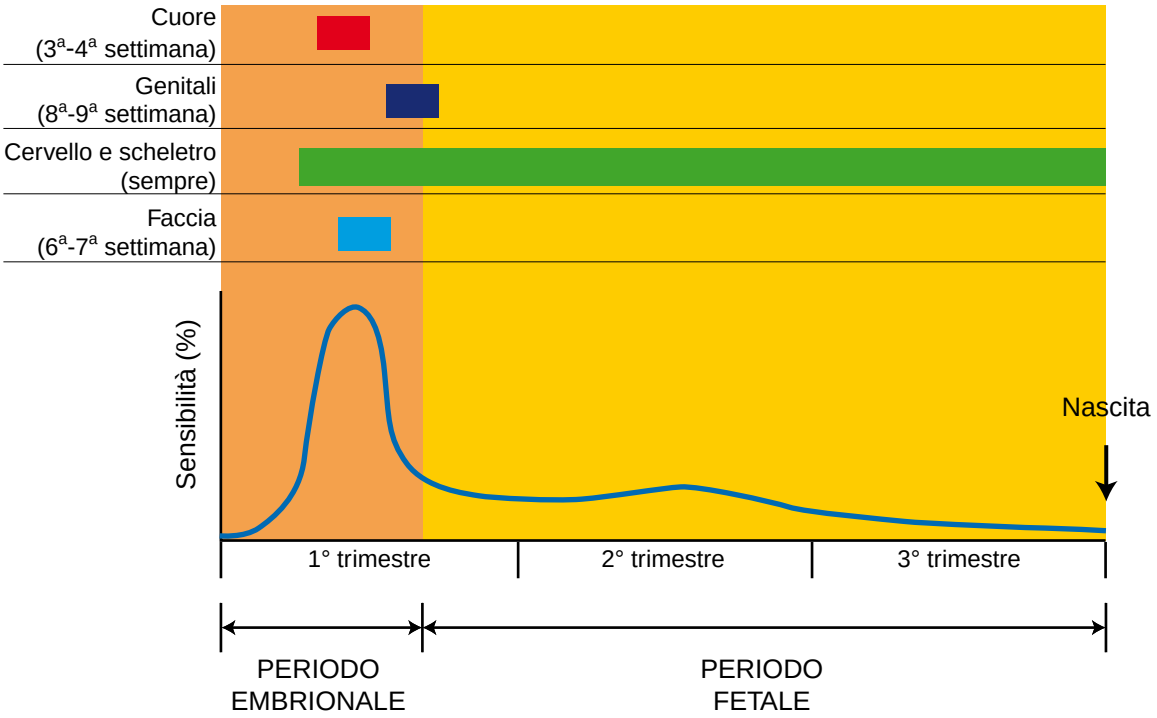



**Figura 3-7** ■ Il grafico mostra la sensibilità generale (curva blu) e particolare di cinque organi del concepito ad agenti teratogeni durante il periodo embrionale e fetale.

natali è ascrivibile ad anomalie congenite. Una malformazione maggiore si riscontra nel 3-4% delle nascite e, inoltre, entro i 5 anni il 7,5% dei bambini presenterà un difetto congenito. L'incidenza varia con il tipo di difetto, l'area geografica, verosimilmente a causa di fattori genetici e/o ambientali (la spina bifida ha un'incidenza di 3-4/1.000 nascite in alcune zone dell'Irlanda, ma si riscontra in 1/1.000 nascite negli Stati Uniti), e le abitudini culturali (i matrimoni tra consanguinei aumentano il rischio di malformazioni congenite). L'età materna avanzata e, in minor misura, quella paterna, può aumentare il rischio di anomalie cromosomiche, specialmente di sindrome di Down. L'eziologia delle anomalie congenite può includere **cause genetiche** e/o **teratogeniche**. I fattori teratogeni includono tossine ambientali, radiazioni, dieta, farmaci, infezioni e disordini metabolici. Un'anomalia è definita **primaria** quando la sua origine può essere rintracciata in un difetto intrinseco del suo sviluppo, **secondaria** quando il difetto dello sviluppo deriva da una causa esterna. Nella Figura 3-8 e nella Tabella 3-3 sono riportate le frequenze di alcune anomalie e una loro classificazione sulla base delle cause.

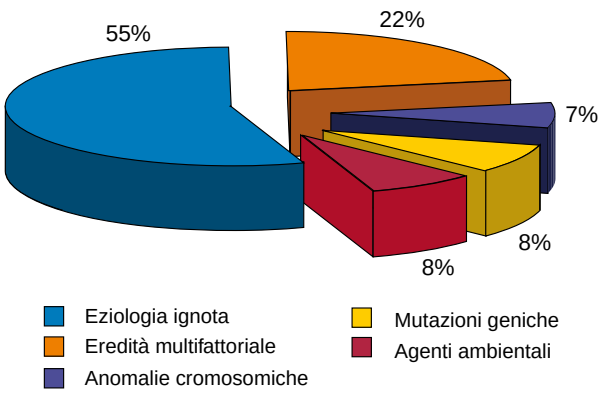



**Figura 3-8** ■ Rappresentazione grafica delle cause delle anomalie congenite.

## Diagnosi e terapia prenatale

Attualmente ci sono diverse metodologie che permettono di verificare la presenza di malformazioni e patologie durante lo sviluppo dell'embrione e del feto. La **diagnosi**

**Tabella 3-3**
Cause di anomalie dello sviluppo embrionale

| Anomalie primarie | Anomalie secondarie |
|---|---|
| Mutazioni geniche | Agenti infettivi (rosolia, Citomegalovirus, varicella, HIV) |
| Anomalie cromosomiche | Farmaci, ormoni, prodotti chimici |
| Anomalie multifattoriali | Agenti fisici (radiazioni ionizzanti)<br>Altri fattori (diabete materno, fenilchetonuria materna)a |

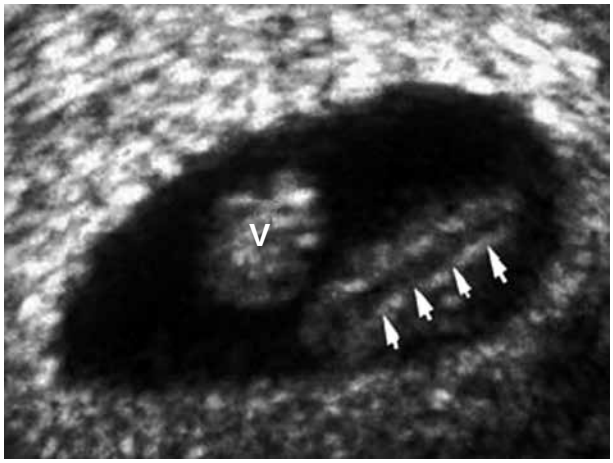



**Figura 3-9** ■ Ecografia di un embrione all'8ª settimana (stadio 23 Carnegie) nella quale in visone dorsale è visibile il tubo neurale (frecce) e il sacco vitellino (V).

**prenatale** è oggi diventata una branca specifica del consultorio genetico. Per diagnosi prenatale si intende l'insieme delle indagini, strumentali e di laboratorio, mediante le quali è possibile monitorare lo stato di salute e di benessere del concepito durante il corso della gravidanza. L'impiego delle tecniche di diagnosi prenatale è volto ad identificare patologie che interessano il concepito su base genetica, infettiva, farmacologica o ambientale. La diagnosi prenatale può essere effettuata con metodi invasivi e non invasivi. I secondi si basano essenzialmente sull'**ecografia** che permette di individuare difetti strutturali dello sviluppo (Fig. 3-9). I metodi invasivi, oltre al prelievo di un blastomero che si effettua prima dell'impianto dell'embrione (vedi Diagnosi genetica preimpianto, Capitolo 9), sono l'**amniocentesi**, il **prelievo dei villi coriali** o il **prelievo di sangue** dal cordone ombelicale (Fig. 3-10). Questi metodi mediante l'analisi del **cariotipo** (l'insieme dei cromosomi) e dei geni delle cellule dell'embrione permettono di individuare diverse patologie. La determinazione del cariotipo permette di evidenziare anomalie cromosomiche, sia numeriche (quali trisomie e monosomie), che strutturali (traslocazioni, delezioni ed inversioni). A volte l'osservazione al microscopio dei cromosomi opportunamente colorati è sufficiente per evidenziare ed identificare tali anomalie. In alcuni casi è necessario eseguire ulteriori analisi dei cromosomi, per studiare nei dettagli l'anomalia in questione, come ad esempio l'**ibridazione fluorescente in situ** (FISH) (Fig. 3-11). Si tratta di una tecnica che utilizza sonde marcate con composti fluorescenti. Una sonda è un frammento di DNA che si lega in modo specifico ad un dato cromosoma o ad una data porzione di esso. Facciamo un esempio: l'osservazione al microscopio ha rivelato la presenza di un particolare cromosoma detto marcatore (in quanto si trova in tutte le cellule esaminate) che somiglia ad una porzione del cromosoma 21. In questo caso si utilizza la sonda specifica per il cromosoma 21: se tale sonda si lega al marcatore vuol dire che si tratta proprio di una porzione del 21. L'analisi del corredo cromosomico non è in grado d'evidenziare la presenza di geni difettosi. Pertanto, per la diagnosi di malattie dovute a singoli geni difettosi (**malattie monogeniche**) dovranno essere utilizzate tecniche molecolari per lo studio del DNA. Una volta per la diagnosi delle malattie genetiche ereditarie ci si basava solo ed esclusivamente sulla storiologia della famiglia. Nell'ultimo decennio l'**analisi del DNA** ha cominciato a rappresentare una metodologia valida nella diagnostica di un numero sempre maggiore

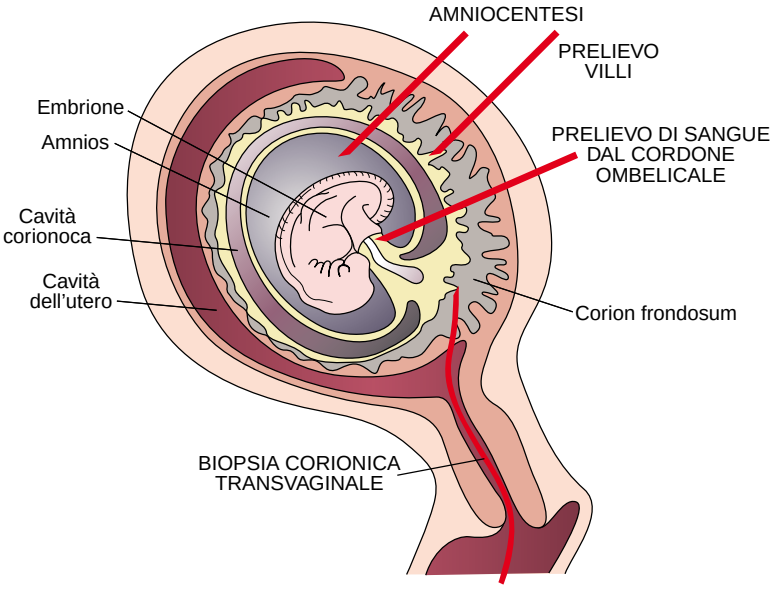



**Figura 3-10** ■ Metodi diversi di diagnosi prenatale.

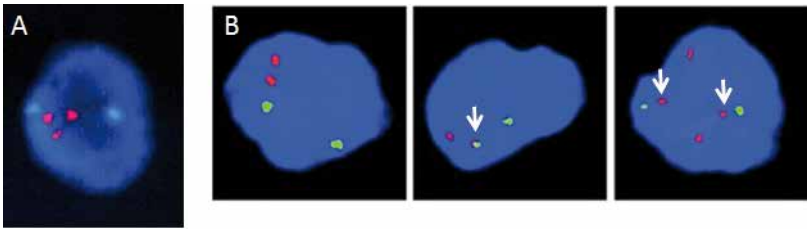



**Figura 3-11** ■ Esempi di analisi FISH. *A)* Tre cromosomi 21 (in rosso) invece dei normali due in un embrione affetto dalla trisomia 21 o sindrome di Down. *B)* Nucleo di una cellula di un individuo normale con due autosomi 14 (verde) e 18 (rosso). Al centro un nucleo con traslocazione del cromosoma 18 (rosso) sul cromosoma 14 (verde) e a destra un nucleo con due cromosomi 18 sopranumerari (per gentile concessione di P. Spitalieri).

di malattie genetiche, soprattutto nel campo delle patologie dovute a difetti di singoli geni (patologie monogeniche), come le talassemie, la fibrosi cistica, la distrofia muscolare e le emoglobinopatie. Il numero delle patologie monogeniche identificabili mediante l'analisi del DNA cresce parallelamente alla determinazione di nuovi geni responsabili della malattia. Attualmente della circa 1000 patologie monogeniche stimate circa 300 possono essere

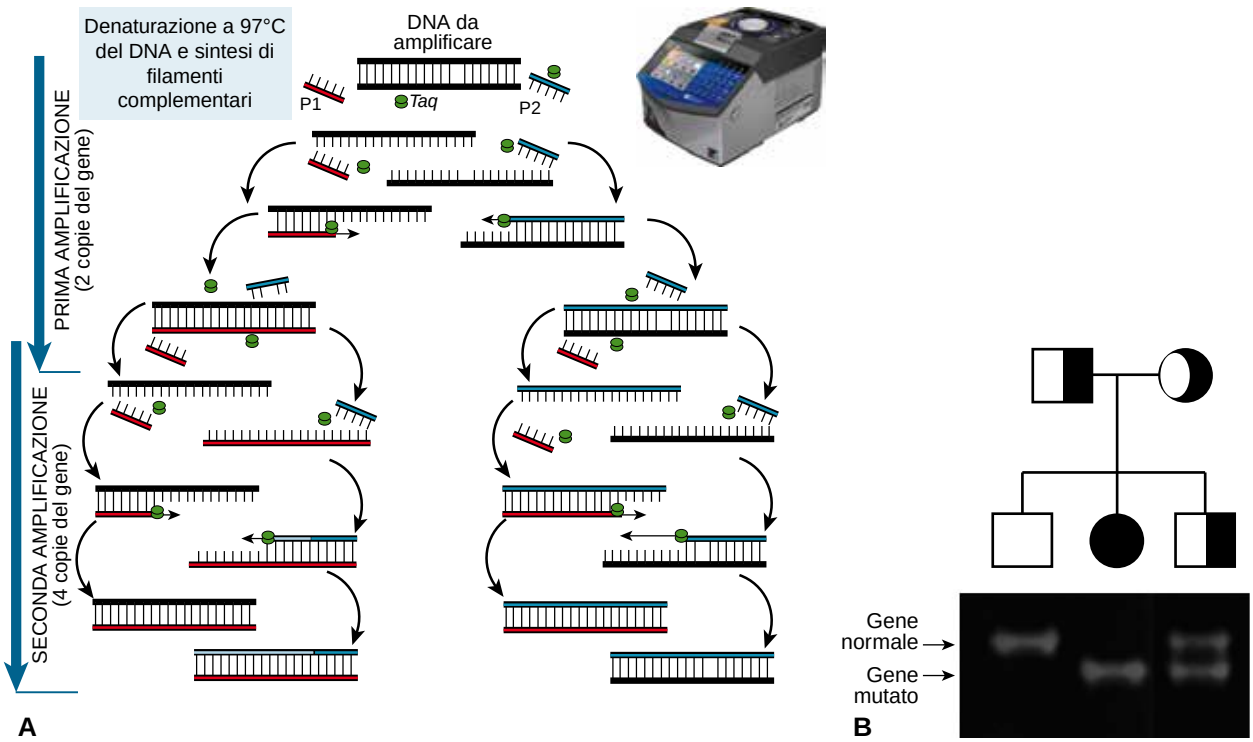



**Figura 3-12** ■ *A)* Schema della tecnica PCR (sono rappresentati solamente i primi due cicli di amplificazione). La Polymerase Chain Reaction (PCR) consente di ottenere un numero esponenziale di copie di un frammento di DNA. In caso di malattie genetiche viene amplificato il gene responsabile di tali stati patologici (ovviamente il gene in questione deve essere stato già identificato). Per amplificare il DNA è necessario partire da una miscela composta da: DNA estratto e purificato; DNA polimerasi termostabile (Taq-polimerasi-DNA); tampone; $MgCl_2$, dNTPs (nucleotidi A, T, G, C); inneschi o primers (nella figura P1 e P2, sequenze oligonucletodiche specifiche del frammento di DNA da amplificare ed analizzare). Una macchina (a destra) esegue in modo automatico tutti i passaggi necessari all'amplificazione e, una volta ottenuta la quantità di frammento di DNA necessaria, questa viene sottoposta ad elettroforesi in gel di uno speciale composto (acrilamide). In base alla presenza o assenza, l'intensità e la posizione della banda di DNA visualizzata con una lampada ad UV nel gel, è possibile determinare difetti nel gene in oggetto. *B)* Tra due individui eterozigoti per un gene mutato (area nera) possono nascere individui con entrambi i geni normali, individui con entrambi i geni mutati e individui con un gene normale e uno mutato; la PCR permette di rivelare la presenza dei geni normali e mutati sulla base della posizione della bande che corrispondono alle sequenze di DNA amplificato formate da un diverso numero di basi nucleotidiche.

oggetto di analisi prenatale. Il metodo di scelta per la diagnosi di molte malattie genetiche è attualmente la **PCR** (**polymerase chain reaction**), soprattutto per i suoi vantaggi di accuratezza e sensibilità (Fig. 3-12).

Se un difetto congenito viene individuato prima della nascita ed è grave, i genitori possono decidere se interrompere la gravidanza. Se si sospettano fattori genetici, è necessario che i genitori eseguano una consulenza genetica. Oltre che mediante un opportuna profilassi, come per esempio prevenire difetti di chiusura del tubo neurale assumendo acido folico da parte della madre, in alcuni casi è possibile intervenire per curare l'embrione mediante intervento chirurgico. Mediante la terapia genica nei casi più disperati si può tentare di introdurre un gene sano al posto di quello difettoso utilizzando diversi approcci sperimentali. Infine vogliamo menzionare il possibile impiego delle cellule staminali con le quali si pensa in futuro di poter rimpiazzare tessuti difettosi nell'embrione e nel feto.

In Italia la legge 194 entrata in vigore nel 1978 e confermata in un referendum memorabile nel 1981 con 68% dei consensi, permette l'interruzione volontaria della gravidanza entro i primi 90 giorni di età gestazionale dell'embrione. L'interruzione della gravidanza è permessa se questa costituisce un grave pericolo per la salute psichica e/o fisica nonché per la vita stessa della gestante, oppure se si siano riscontrate gravi anomalie o malformazioni fetali.

## Letture consigliate

Bonnisken A. Genetic diagnosis of human embryo. The Hastings Center Report, Vol. 22, 1992.

Fulcheri E, Bulfamante G, Resta L, Taddei GL. Embryo and fetal pathology in routine diagnostics: what has changed and what needs to be changed. Pathologica 98, 1, 1-36, 2006.

Gilbert-Barness E, Debich-Spicer D, Opitz JM, Williams M, Porter KB, Guidi S. Embryo and fetal pathology: color atlas with ultrasound correlation, Cambridge University Press, 2004.

Ishiwata I, Tokieda Y, Kiguchi K, Sato K, Ishikawa H. Effects of embryotrophic factors on the embryogenesis and organogenesis of mouse embryo in vitro. Hum Cell 13, 185-95, 2000.

Largo RH, Walli R, Duc G, Fanconi A, Prader A. Evaluation of perinatal growth. Presentation of combined intra- and extrauterine growth standards for weight, length and head circumference. Helv Paediatr Acta 35, 419-436, 1980.

Lyall EG, Blott M, de Ruiter A, Hawkins D, Mercy D, Mitchla Z, Newell ML, O'Shea S, Smith JR, Sunderland J, Webb R, Taylor GP. Guideliness for the management of HIV infection in pregant women and the prevention of mother-to child transmission. HIV Med 2, 314-34, 2001.

Ness RB, Grisso JA, Hirschinger N, Markovic N, Shaw LM, Day NL, Kline J. Cocaine and tobacco use and the risk of spontaneous abortion. NEJM 340, 333-339, 1999.

Nowack E. Die sensible Phase bei der Thalidomid-Embryopathy. Humangenetik 1, 516-536, 1990.

O'Rahilly R, Müller F. Developmental stages in human embryos. DC Carnegie Institution of Washington, 1987.

O'Rahilly R, Müller F. Embryologie und Teratologie des Menschen, Huber Verlag, 1999.

Paulus WE. Pharmacotherapy in pregnancy. Ther Umsch 56, 602-607, 1999.

Rosenblatt DS, Fraser FC, Roy DJ. Folic acid to prevent neural tube defects: time for food fortification. Clin Invest Med 19, 202-203, 1997.

Shiota K. Teratothanasia: prenatal loss of abnormal conceptuses and the prevalence of various malformations during human gestation. Birth Defects Orig 29, 189-99, 1993.

Steghaus-Kovac S. Stem cells as potential nerve therapy.Science 285, 650-651, 1999.

Wilmut J. Human cells from cloned embryos in research and therapy. BMJ 328, 415-416, 2004.

4

# Cellule staminali: proprietà biologiche e potenzialità terapeutiche

Antonio Musarò

Negli ultimi anni l'interesse per gli studi sulle cellule staminali è cresciuto enormemente sia tra gli scienziati addetti ai lavori sia nell'opinione pubblica. Spesso però si fa molta confusione su che cosa siano veramente le cellule staminali, dove si trovino e se e come esse possano effettivamente essere utilizzate per curare patologie di vario genere. Per questa ragione, per le numerose tematiche embriologiche coinvolte e le problematiche, anche di ordine etico, sorte oggi intorno alle cellule staminali, riteniamo che queste straordinarie cellule meritino un capitolo a sé stante di un libro di Embriologia umana moderno.

In primo luogo cercheremo di rispondere a due domande: che cosa sono e quali sono le cellule staminali e che funzioni svolgono nel nostro corpo.

## ORIGINE DEL TERMINE "CELLULA STAMINALE"

Il termine "cellule staminali" appare per la prima volta nella letteratura scientifica nel 1868 nelle opere dell'eminente biologo tedesco Ernst Haeckel. Haeckel, uno dei principali sostenitori della teoria dell'evoluzione di Darwin, disegnò un certo numero di alberi filogenetici per rappresentare l'evoluzione degli organismi da antenati comuni e chiamò questi alberi "Stammbäume" (in tedesco alberi genealogici o "alberi staminali"). In questo contesto, Haeckel usò il termine "Stammzelle" (in tedesco, cellule staminali) per descrivere l'organismo unicellulare antenato da cui Haeckel presupponeva che tutti gli organismi pluricellulari si fossero evoluti. Successivamente, trasponendo i concetti dell'evoluzione (filogenesi) all'embriologia (ontogenesi), Haeckel propose che anche l'uovo fecondato potesse essere chiamato cellula staminale. Haeckel quindi usò il termine cellula staminale in due sensi: come l'antenato unicellulare di tutti gli organismi multicellulari e come cellula uovo fecondata che dà origine a tutte le cellule dell'organismo.

Un contributo notevole al concetto di cellula staminale è stato poi dato dagli studi di altri importanti scienziati, quali August Weismann (Weismann, 1885), Alexander Maximow (Maximow, 1908), Wera Dantschakoff (Dantschakoff, 1908), Ernst Neumann (Neumann, 1912) e molti altri, i quali iniziarono ad usare il termine cellula staminale per riferirsi a singole cellule capostipiti di una discendenza cellulare (come ad esempio le cellule del sangue).

## DEFINIZIONE DI CELLULA STAMINALE

La maggior parte degli scienziati oggi concorda nel definire la cellula staminale degli organismi animali pluricellulari come una cellula indifferenziata che possieda principalmente due proprietà:

1. **capacità di dividersi per mitosi numerose volte mantenendo lo stato indifferenziato** (il termine inglese con cui si indica questa proprietà è *self renewal,* "autorinnovamento"). Questa proprietà è spesso associata alla capacità di formare cellule che rimangono raggruppate e che derivando da un'unica madre sono chiamate cloni cellulari;
2. **capacità di differenziare in tipi cellulari specializzati**.

Sulla base di questa definizione potremmo suddividere le cellule staminali in tre famiglie, proprie di tre diversi periodi della vita di un organismo, ovvero cellule staminali dell'embrione, del feto e dell'adulto o dei tessuti differenziati (Tab. 4-1). Questa suddivisione, come d'altronde altre possibili classificazioni delle cellule staminali, ha dei limiti in quanto è possibile che una popolazione di cellule staminali formatesi in un periodo della vita sia funzionalmente attiva e permanga per più periodi. Per esempio come vedremo nel Capitolo 17, le cellule staminali ematopoietiche dell'adulto si pensa originino durante il periodo embrionale e permangano per i successivi periodi della vita di un individuo. All'interno di ogni famiglia e tra le diverse famiglie delle cellule staminali esistono poi delle differenze per quello che riguarda le caratteristiche delle due suddette proprietà, che a volte sono state utilizzate per altre classificazioni delle cellule staminali, e che discuteremo nei prossimi paragrafi. Inoltre, se si accetta la suddivisione delle cellule stami-

**TABELLA 4-1**
Una possibile classificazione delle cellule staminali

| |
|---|
| Cellule staminali dell'embrione |
| Cellule staminali fetali (per es., del cordone ombelicale) |
| Cellule staminali adulte o dei tessuti differenziati (cellule staminali ematopoietiche, cellule staminali epiteliali, cellule staminali mesenchimali, spermatogoni, cellule staminali neurali, cellule satelliti dei muscoli scheletrici) |
| Cellule staminali "artificiali" (ECC, ESC, EGC, iPS) |
| Cellule staminali dei tumori |

nali per periodi della vita bisogna aggiungere due ulteriori famiglie che non rientrano in questa classificazione: le cellule staminali che potremmo definire "artificiali" ovvero che non esistono come tali in natura, ma sono state generate dagli scienziati in coltura, e le cellule staminali dei tumori (Tab. 4-1).

## QUALI SONO LE FUNZIONI DELLE CELLULE STAMINALI?

### Aumento/mantenimento del numero delle cellule di una popolazione

Le funzioni delle cellule staminali derivano direttamente dalle loro principali proprietà riportate sopra. In primo luogo, mediante il *self renewal* le cellule staminali possono aumentare/mantenere il numero delle cellule di una popolazione e/o dare origine a cellule figlie parzialmente differenziate (**cellule staminali progenitrici**); queste a loro volta possono continuare a dividersi per *self renewal* prima di differenziare e perdere o ridurre fortemente la capacità di dividersi. Le caratteristiche del *self renewal* differiscono tra le diverse popolazioni di cellule staminali. In generale, nelle cellule staminali dell'embrione il periodo del *self renewal* ha una durata limitata ad alcuni cicli di divisione al termine dei quali le cellule differenziano. Le cellule staminali "artificiali", quali le cellule staminali embrionali (ESC, embryonal stem cells) derivate come vedremo più avanti dalla massa cellulare interna (inner cell mass, ICM) della blastociti, hanno invece un *self renewal* illimitato nel tempo; mantenute in opportune condizioni di coltura continuano a dividersi con un rapido ciclo cellulare (circa 15-16 ore) producendo gruppi di cellule chiamati cloni. D'altro canto, le cellule staminali adulte hanno una capacità *self renewal* che dura per tutta la vita di un individuo, ma al contrario delle ESC si dividono raramente. Nei tessuti adulti, un primo significativo aumento del numero delle cellule di una popolazione avviene soprattutto a seguito della proliferazione delle cellule figlie delle cellule staminali capostipiti, il cui destino finale è quello differenziativo; queste, chiamate **cellule staminali progenitrici** o **precursori** o ancora semplicemente **progenitori di linea**, si comportano in modo simile alle cellule staminali degli embrioni; dopo un numero definito di divisioni *self renewal* entrano in una specifica via differenziativa o danno origine a cellule che mantengono un transiente stato di proliferazione, *transit amplifying cells* (cellule di passaggio amplificanti), prima di differenziare (Fig. 4-1). Il mantenimento della capacità di *self renewal* da parte di una cellula staminale dipende probabilmente dai segnali che riceve dal **microambiente**, definito spesso con il termine inglese *niche* (nicchia), in cui essa viene a trovarsi e dall'attivazione nel citoplasma e nel nucleo di molecole che controllano almeno tre processi fondamentali per l'attività di una cellula: il ciclo cellulare, la morte cellulare e la trascrizione di specifici fattori di trascrizione genica. Discuteremo più avanti alcuni di questi segnali.

### Formazione di tipi cellulari differenziati

La formazione di tipi cellulari differenziati è la seconda funzione delle cellule staminali. Le cellule staminali sono cellule poco o nulla differenziate in grado di differen-

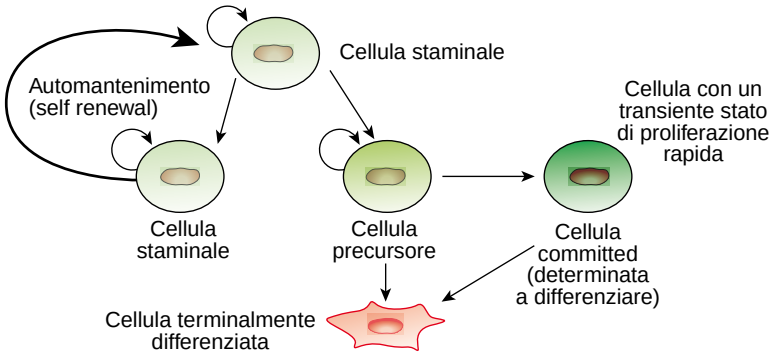
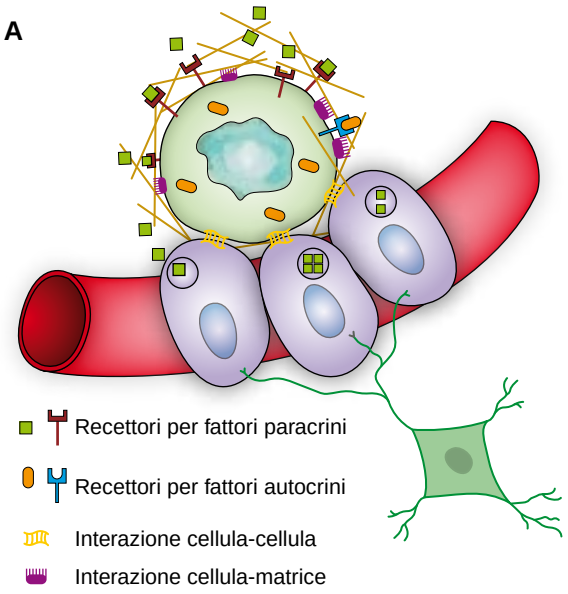



**FIGURA 4-1** ■ Rappresentazione schematica delle proprietà biologiche delle cellule staminali. La cellula staminale si divide normalmente per divisione asimmetrica dando origine a due cellule figlie con diversi destini differenziativi: una cellula figlia rimane cellula staminale, partecipando all'automantenimento del pool di staminali, l'altra (cellula precursore) entra in un percorso differenziativo. La cellula precursore può a sua volta dividersi per divisione simmetrica, aumentando la popolazione cellulare, entra poi in una fase di determinazione (*commitment*), con un transiente stato di proliferazione rapida e poi differenzia. Alternativamente, la cellula precursore può dare origine direttamente ad una cellula terminalmente differenziata.



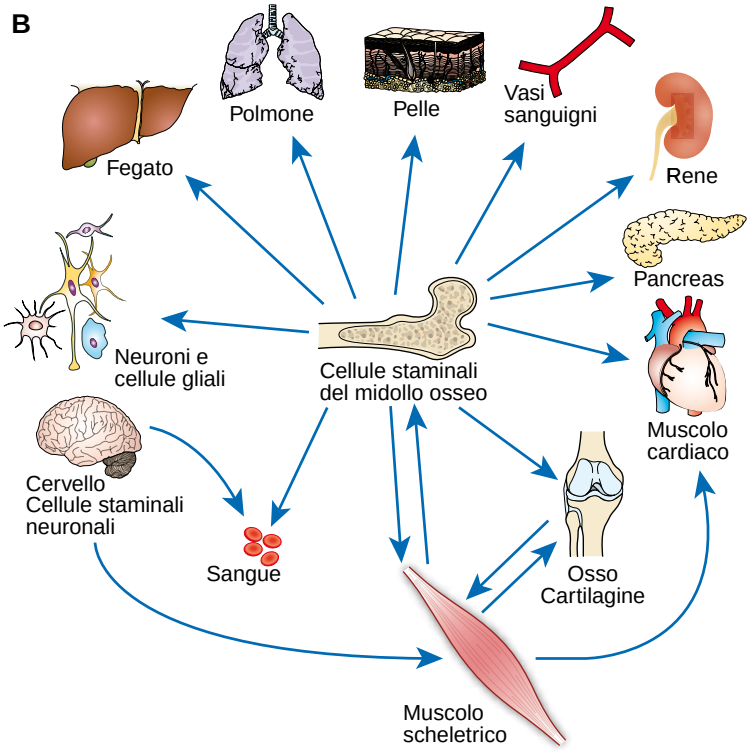




**Figura 4-2** *A)* Rappresentazione schematica di alcuni elementi di una "nicchia" di una cellula staminale. La cellula staminale (in verde chiaro), riceve diversi segnali dal microambiente circostante costituito da cellule vicine (talora anche cellule nervose), matrice e vasi sanguigni, sottoforma di molecole adesive e solubili. Questi segnali sono necessari al mantenimento delle proprietà delle cellule staminali. *B)* Rappresentazione schematica della plasticità delle cellule staminali dell'adulto. Cellule staminali prelevate dalla loro nicchia e costrette a risiedere in un'altra regione del corpo possono differenziare in tipi cellulari anche diversi da quelli a cui danno normalmente origine nella loro sede naturale.

ziare in uno o due (**uni-bi-potenza**), numerosi (**multipotenza**), molti (**pluripotenza**) o tutti (**totipotenza**) i tipi cellulari di un organismo. Alla discussione di questa proprietà dedicheremo un paragrafo più avanti. Per ora vogliamo sottolineare solamente due aspetti. Questa funzione dipende dalla **plasticità del genoma** della cellula staminale e può essere modulata dalla nicchia in cui la cellula si trova. La plasticità del genoma consiste in una particolare conformazione della cromatina, le cui basi molecolari sono ancora in gran parte ignote, che consente ai geni che controllano il differenziamento delle diverse linee cellulari di rimanere accessibili alla trascrizione. Normalmente le cellule somatiche vanno incontro ad una progressiva perdita di plasticità del genoma man mano che differenziano. Come è noto, e come vedremo anche nel Capitolo 8 dove spiegheremo che cosa è la clonazione, tutte le cellule di un organismo contengono lo stesso genoma e lo mantengono qualsiasi sia

il tipo cellulare in cui differenziano. Si stima che una cellula umana differenziata nell'arco della sua vita trascriva tra i 2.000 e i 3.000 geni dei circa 30.000 che formano il genoma umano; i geni trascritti comprendono quelli che servono per le strutture e le attività comuni a tutte le cellule e i geni che codificano per le proteine necessarie alla definizione e al mantenimento delle caratteristiche morfologiche e funzionali specifiche della cellula differenziata. Per esempio, un neurone contiene nel suo nucleo, ma in forma inattiva e mai più attivabili, i geni che, invece attivi in una cellula muscolare, ne determinano le caratteristiche morfofunzionali; ovviamente nella cellula muscolare sono per sempre inattivi i geni che determinano le caratteristiche di un neurone. In una cellula staminale, per così dire, rimangono potenzialmente attivabili i geni di un neurone o quelli di una cellula muscolare o entrambi; maggiore è il numero dei geni di una linea cellulare che rimangono attivabili maggiore è la plasticità del genoma.

Il microambiente è costituito da una serie di segnali molecolari che la cellula staminale riceve dalle cellule vicine e dalla matrice extracellulare. Come già anticipato sopra, per le cellule staminali adulte il microambiente in cui esse si trovano all'interno di un determinato tessuto è definito "nicchia". Finché rimane all'interno della sua nicchia naturale, la cellula staminale mantiene le sue proprietà e potenzialità, ma se trasferita in un diverso microambiente può anche acquisire una diversa potenzialità differenziativa. In particolare è stato osservato che quando una cellula staminale è prelevata dalla sua naturale nicchia e costretta a risiedere in un altro tessuto, essa può produrre cellule progenitrici che intraprendono destini differenziativi diversi da quelli previsti dalla nicchia originaria (Fig. 4-2A). Ecco quindi, ad esempio, che cellule staminali neuronali possono essere indotte a differenziare in cellule muscolari, e cellule staminali emopoietiche in cellule muscolari (Fig. 4-2B).

L'aumento di numero delle cellule differenziate di una determinata popolazione può avere conseguenze diverse a seconda del periodo e del tessuto in cui si verifica. Nell'embrione, questo aumento serve principalmente alla formazione dei tessuti che si dispongono a formare un organo e al suo accrescimento, nell'adulto alla sostituzione di cellule in degenerazione per un ricambio fisiologico ("omeostasi tissutale") o per un danno di tipo patologico. È proprio da queste fondamentali funzioni svolte dalle cellule staminali nell'adulto che nasce l'interesse dell'opinione pubblica per queste cellule. È possibile utilizzare le cellule staminali per rimpiazzare tessuti invecchiati o danneggiati da patologie o addirittura ricostruire organi usurati o perduti a seguito di traumi?

## UN PO' DI STORIA

Il grande interesse dell'opinione pubblica sulle cellule staminali nasce soprattutto a seguito delle ricerche che nel 1998 hanno portato un gruppo di ricercatori australiani guidati da James Thompson a produrre in vitro cloni di **cellule staminali embrionali (ESC)** o **cellule ES**, a partire da embrioni umani allo stadio di blastocisti; le colonie di ESC venivano generate piuttosto facilmente in una piastra di coltura, producevano milioni di cellule staminali che potevano essere mantenute in laboratorio per un tempo indefinito e, manipolate in vari modi, erano in grado di differenziare sia in vivo che in vitro (vedi più avanti) in ogni tipo di cellula (Fig. 4-3). Nello stesso anno un altro gruppo di ricercatori americani sotto la guida di John Gearhart riportava che cellule molto simili alle ESC potevano essere generate in vitro a partire da cellule germinali di embrioni umani, da cui il nome di **cellule germinali embrionali (EGC**, embryonic germ cells). Le implicazioni di queste ricerche erano che fosse ormai aperta la strada per la produzione di ogni tipo di tessuto umano, utilizzabile per curare patologie degenerative e riparare danni tissutali. In realtà i biologi conoscevano fin dagli anni '60 che diversi tessuti di un individuo adulto, in particolare i tessuti emopoietici, possiedono cellule staminali ovvero cellule che, come abbiamo sopra spiegato, sono in grado di autoriprodursi per tutta la durata della vita di un individuo e generare alla bisogna cellule differenziate di vario tipo. Di norma però, la coltura e la possibilità di produrre tessuti dalle cellule staminali adulte erano, per ragioni che vedremo più avanti, piuttosto problematiche. D'altra parte ESC ed EGC erano già state prodotte nei topi; le prime agli inizi degli anni '80 da due gruppi di ricercatori afferenti a Martin J. Evans e Matthew H. Kaufman in Inghilterra e a Gail R. Martin negli Stati Uniti, le seconde nel 1992 contemporaneamente dai gruppi di Peter Donovan e di Brigid Hogan negli Stati Uniti. Le ricerche che avevano portato alla produzione delle ESC e EGC di topo si basavano su studi fatti addirittura circa venti anni prima dal ricercatore americano Leroy Stevens. Stevens negli anni '60 lavorando sui tumori, aveva dimostrato che nei topi i teratocarcinomi, bizzarri tipi di tumori contenenti cellule indifferenziate e svariati tipi di tessuti differenziati, originavano da cellule germinali trasformatesi in cellule staminali; per la loro origine embrionale Stevens aveva chiamato queste cellule, **cellule di carcinoma embrionale** (**EC**, embryonic carcinoma cells). Fino alla produzione delle ESC umane, gli studi sulle cellule EC e ES di topo erano stati sostanzialmente condotti da embriologi e biologi dello sviluppo che utilizzavano queste cellule come formidabili modelli sperimentali per capire quali fossero i meccanismi alla base della staminalità e del differenziamento cellulare.

## L'evoluzione dei meccanismi di rigenerazione tissutale: dall'idra all'uomo

L'ambizione a rigenerare tessuti e organi del corpo sempre presente nella biomedicina si è riaccesa alla fine degli anni '90 come sopra descritto con le ricerche sulle ESC umane e quando subito dopo si è scoperto che cellule staminali sono presenti anche in tessuti differenziati come il muscolare cardiaco e il nervoso considerati non in grado di rigenerare.

Il concetto di rigenerazione tissutale appare probabilmente per la prima volta nel "Prometeo incatenato" di Eschilo. Quando Prometeo, trasgredendo la legge de-

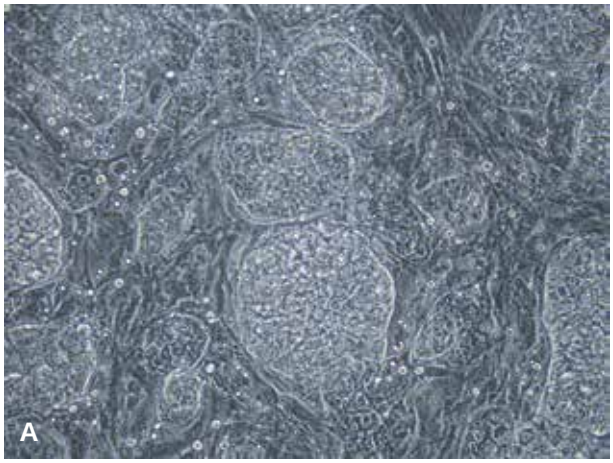
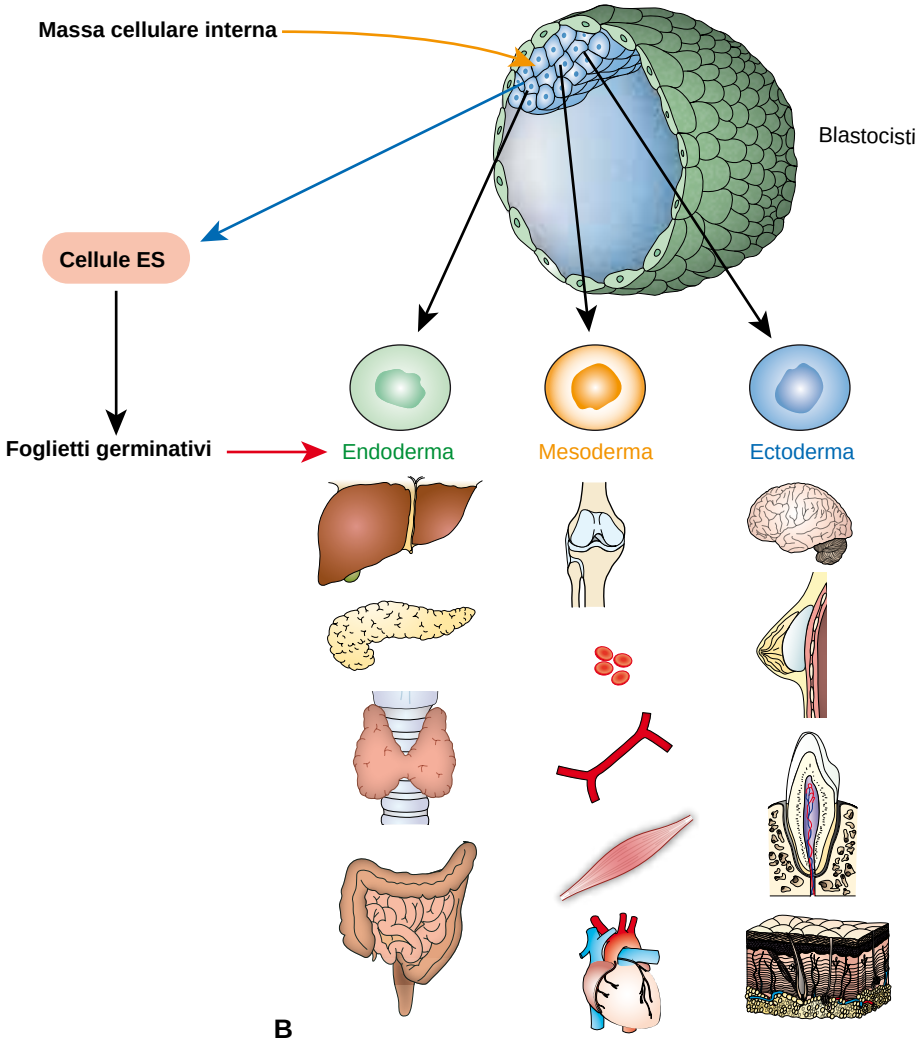



**FIGURA 4-3** ■ *A)* Immagine di microscopia ottica di cellule staminali embrionali umane (ESC) coltivate in vitro. *B)* Pluripotenzialità delle cellule staminali embrionali. Le staminali embrionali (cellule ES) originano in coltura da una regione della blastocisti chiamata massa cellulare interna (inner cell mass, ICM) (vedi Capitolo 9) e possono dare origine a tutti i tipi cellulari che normalmente originano dai tre foglietti germinativi primari dell'embrione (vedi Capitolo 9): endoderma (per es., cellule epatiche, cellule del pancreas, cellule della tiroide, cellule dell'epitelio intestinale); mesoderma (per es., cellule della cartilagine e dell'osso, cellule del sangue e dei vasi sanguigni, cellule muscolari scheletriche, cellule del cuore); ectoderma (per es., cellule del sistema nervoso, della ghiandola mammaria, dello smalto dei denti, cheratinociti dell'epidermide).




gli dei, rubò il fuoco per farne dono agli uomini e insegnare loro la civiltà e le arti, la punizione fu brutale: Giove incatenò Prometeo su una grande roccia del monte Caucaso, dove ogni giorno una grande aquila gli squarciava il ventre e divorava il fegato col becco adunco; durante la notte il fegato ricresceva, le ferite si rimarginavano e il mattino dopo Prometeo doveva subire nuovamente il martirio. Fortunatamente per Prometeo,

il suo fegato era ben preparato per il suo rinnovo giornaliero, dal momento che proprio il fegato rappresenta uno degli organi del corpo con la più alta potenzialità rigenerativa. Sicuramente Eschilo ignorava questa straordinaria capacità del fegato di rigenerare nei mammiferi (75% della massa di tessuto perso entro una settimana!), ma forse la scelta non doveva essere stata proprio casuale in quanto se l'aquila avesse scelto per il suo pasto un organo diverso dal fegato, per esempio il cuore o il cervello, il povero Prometeo non sarebbe sopravvissuto alla terribile punizione.

Oggi noi sappiamo che per tutta la vita i tessuti del nostro corpo vanno incontro a un continuo processo di rinnovamento e possono riparare alcuni danni causati da patologie o traumi. La riparazione delle ferite comporta il reclutamento e la proliferazione di cellule capaci di ristabilire forma e funzioni dei tessuti danneggiati. Non c'è dubbio che alcuni organi, come il fegato e la pelle, o tipi cellulari come le cellule del sangue, hanno un elevato potenziale rigenerativo, rispetto ad altri come il cuore o il cervello, in cui i meccanismi di riparo risultano fortemente limitati.

Ma perché alcuni tessuti rigenerano meglio di altri? Come mai alcune specie di animali possono rigenerare in pochi giorni addirittura interi organi come arti o coda? L'uomo sarà mai in grado di rigenerare i suoi organi? La rigenerazione cellulare è uno dei processi omeostatici più diffusi tra i metazoi, ma l'efficienza di questo processo non è uguale in tutte le specie. In particolare, alcuni organismi semplici, come l'idra e la planaria, presentano un sorprendente meccanismo rigenerativo: dopo un'amputazione questi animali sono in grado di rigenerare la parte mancante. Questa osservazione fu riportata per la prima volta nel 1744 dal naturalista svizzero Abraham Trembley il quale, tagliando sia in senso orizzontale sia verticale l'idra, dimostrò come da ciascuna metà potesse rigenerarsi la parte mancante. Tale processo è stato successivamente indicato come rigenerazione bidirezionale per distinguerlo dalla rigenerazione unidirezionale in cui altre specie, quali gli anfibi e rettili, rigenerano intere parti del corpo, quali cervello, cuore, midollo spinale, intestino, retina e persino un arto (Fig. 4-4). Tuttavia, la sorprendente potenzialità rigenerativa osservata in alcune specie animali non è stata sfortunatamente preservata attraverso l'evoluzione, per ragioni che non sono ancora completamente chiare. Di conseguenza, le specie superiori, uomo compreso, hanno perso la capacità di rigenerare organi pur conservando una certa facoltà di rigenerare alcuni tessuti.

Una domanda fondamentale a cui molti ricercatori hanno cercato di dare una risposta è in che cosa la rigenerazione tissutale di un anfibio differisca da quella di un organismo superiore. Una serie di evidenze sperimentali hanno chiarito che nelle specie animali in grado di rigenerare organi, la rigenerazione dei tessuti avviene a seguito della formazione di una struttura chiamata **blastema**. In breve, dopo un danno a livello degli arti o della coda, un sottile strato di cellule epidermiche avanza verso il bordo del taglio, formando una semplice struttura epidermica. Al di sotto di questo primo tessuto rigenerativo si trova una massa di cellule dedifferenziate, capaci di proliferare e differenziare in nuovi tipi cellulari. L'insieme di questi tessuti è appunto chiamato blastema. In particolare, si è osservato che negli urodeli la rigenerazione sembra coinvolgere una parziale o totale perdita dello stato differenziato e la ripresa del ciclo cellulare nei

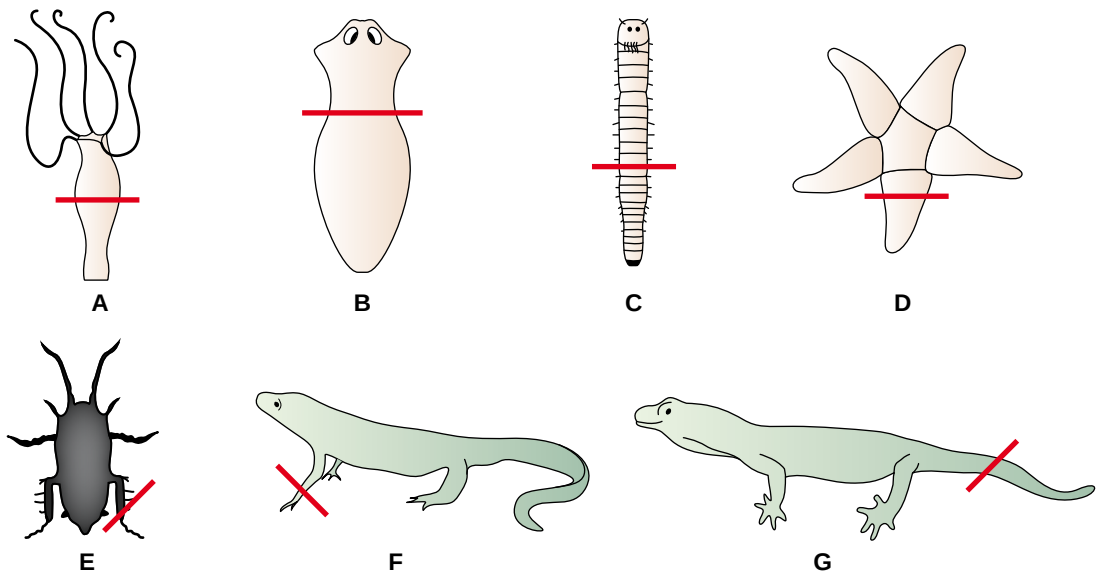



**Figura 4-4** ■ Disegno schematico di specie animali in cui si osserva una rigenerazione bidirezionale (da *A* a *D*) o unidirezionale (da *E* a *G*). Le specie animali capaci di una rigenerazione bidirezionale sono in grado di rigenerare un intero organismo a partire da entrambi i frammenti corporei amputati. *A)* Idra; *B)* planaria; *C)* nereide o verme marino; *D)* stella marina. Nella rigenerazione unidirezionale le specie animali sono in grado di rigenerare alcune appendici del corpo. *E)* Scarafaggio; *F)* tritone; *G)* lucertola. La regione di amputazione è rappresentata da una linea rossa.

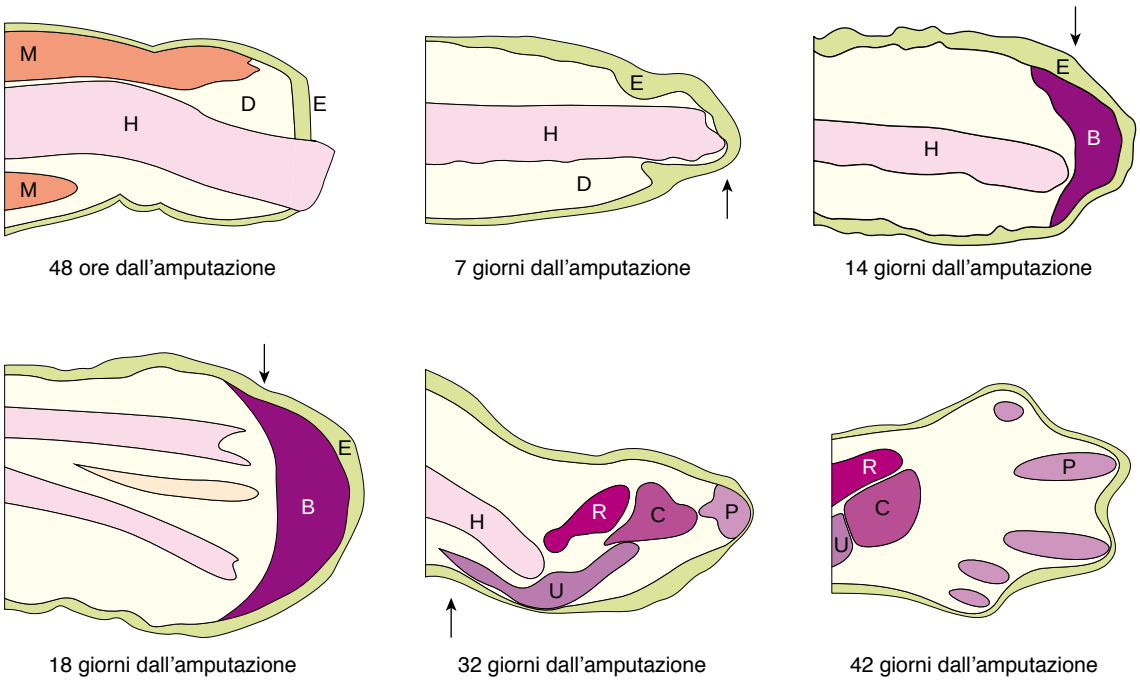



**FIGURA 4-5** ■ Rappresentazione schematica dei cambiamenti istologici coinvolti nella rigenerazione di un arto amputato negli anfibi. A 48 ore dall'amputazione si osserva il sottile strato epidermico (E) che ricopre la regione di amputazione, anche se l'omero (H) è ancora sporgente a causa della retrazione dei tessuti molli dopo l'amputazione. Vicino la regione di amputazione si osserva un'ampia area di tessuto muscolare sdifferenziato (D), anche se è possibile notare ancora del muscolo differenziato (M). A 7 giorni dall'amputazione il processo di sdifferenziamento procede progressivamente dalla regione prossimale a quella più distale del sito di amputazione. A 14 giorni si osserva la formazione del blastema (B), il quale è particolarmente evidente a 18 giorni dopo amputazione. Nelle fasi successive (35 e 42 giorni dopo amputazione) le cellule del blastema fuoriescono dal ciclo cellulare ed entrano in una nuova via differenziativa dando origine ai tessuti terminalmente differenziati e generando un'esatta copia dell'arto amputato. H: omero, R: radio, U: ulna, C: cartilagine, P: falangi. La freccia indica la regione di amputazione.

tessuti interessati dalla ferita (Fig. 4-5). Il risultato finale è che popolazioni cellulari anche completamente differenziate sdifferenziano, rientrano nuovamente nel ciclo cellulare e successivamente vanno incontro ad un nuovo processo di differenziamento per ricostruire una fedele replica della porzione del corpo mancante. La caratterizzazione degli eventi molecolari della rigenerazione negli urodeli ha dimostrato che uno dei fattori responsabili del processo sdifferenziativo è la forma attiva della proteina trombina, più conosciuta per il suo ruolo nella coagulazione del sangue; il rientro nel ciclo cellulare invece è mediato dalla fosforilazione della proteina del retinoblastoma (RB), fattore trascrizionale conosciuto come una delle molecole chiave del controllo del ciclo cellulare negli eucarioti. Come noto la normale funzione di RB è di bloccare la divisione cellulare, inibendo l'azione di fattori di trascrizione della famiglia E2F coinvolti nell'inizio della duplicazione del DNA; in particolare, RB inibisce la progressione del ciclo cellulare quando è defosforilata, mentre lo promuove quando è fosforilata.

Questi risultati hanno evidenziato come il blastema rappresenti uno straordinario esempio di plasticità cellulare in cui diversi fattori orchestrano un efficiente processo ripartivo. Risulta quindi affascinante per la scienza moderna cercare di mimare nelle specie superiori lo sviluppo di un blastema e identificare le basi molecolari dello sdifferenziamento e dell'identità posizionale delle diverse componenti cellulari che partecipano ai meccanismi di rigenerazione e riparo.

Nelle specie animali più evolute, tuttavia, i processi di riparo e rigenerazione sembrano avvenire con meccanismi in gran parte diversi da quelli della formazione del blastema. Forse l'unico processo che nelle specie superiori in qualche modo ricorda la formazione del blastema è la riparazione di una frattura di un osso da parte del "callo osseo". In ogni caso, negli organismi più evoluti la rigenerazione fisiologica di un tessuto e la possibilità di riparare danni tissutali si basa sulla presenza costitutiva di cellule indifferenziate o solo parzialmente differenziate, chiamate per l'appunto cellule staminali, dotate di proprietà che gli scienziati stanno pian piano svelando.

## I SEGRETI DELLE CELLULE STAMINALI

### La divisione simmetrica e asimmetrica

Come fanno le cellule staminali a riprodursi rimanendo indifferenziate e allo stesso tempo generare cellule in grado di differenziare? Alla base di queste proprietà ci

sono due modalità di divisione mitotica definite simmetrica e asimmetrica. Nella **mitosi simmetrica** una cellula staminale dà origine a due cellule figlie che rimangono entrambe staminali come la cellula madre o che sono entrambe successivamente indotte a differenziare (Fig. 4-6). Nell'embrione un cambiamento della posizione delle cellule staminali e dei segnali molecolari che esse ricevono controlla probabilmente quale sarà l'esito della divisione simmetrica. È chiaro che l'eventuale mantenimento di una riserva costante di cellule staminali, come si verifica nell'adulto, richiede un alternarsi di questi due tipi di divisione simmetrica. Come possa verificarsi questa alternanza nella nicchia delle staminali non è chiaro. D'altra parte come vedremo più avanti, la maggior parte delle cellule staminali adulte sembra dividersi con mitosi asimmetrica. Divisioni simmetriche con produzione di cellule figlie che mantengono le proprietà della cellula madre si verificano ogni qualvolta sia richiesto un aumento del numero di cellule staminali, cosa che accade per esempio durante lo sviluppo embrionale sia degli invertebrati che dei vertebrati. Inoltre, divisioni simmetriche di questo tipo sono comuni durante il riparo delle ferite e la rigenerazione tissutale. Va ricordato che vanno tipicamente incontro a divisione simmetrica le cellule staminali tumorali e le ESC.

La **mitosi asimmetrica** consente ad una cellula staminale di dare origine a due cellule figlie con destino differenziativo diverso: una che rimane cellula staminale, consentendo così il mantenimento di una riserva costante di cellule staminali, l'altra capace di intraprendere un destino differenziativo che la porterà a diventare una cellula specializzata (Figg. 4-1 e 4-6). Come sopra ricordato, la maggior parte delle cellule staminali adulte va incontro di norma a divisione asimmetrica. In generale, le cellule staminali possono presentare sia divisioni cellulari simmetriche che asimmetriche. Ad esempio, nell'embrione i progenitori neurali ed epidermici vanno incontro inizialmente a divisione simmetrica, che permette di espandere la popolazione di cellule staminali (Fig. 4-7A,C), per poi passare, nella seconda metà del periodo di gestazione e nella vita post-natale, ad una divisione prevalentemente asimmetrica, che permette una espansione del numero di cellule che andranno incontro a differenziamento (Fig. 4-7B). Probabilmente la capacità di passare dalla divisione simmetrica a quella asimmetrica e viceversa, a seconda degli stimoli di sviluppo e ambientali, è un adattamento fondamentale che aumenta la capacità rigenerativa di un tessuto danneggiato. Tuttavia, un potenziale rischio nell'aumentato utilizzo di divisioni simmetriche da parte delle cellule staminali è una maggiore incidenza a contrarre tumori, soprattutto in considerazione del fatto che molti tumori frequentemente derivano dalla trasformazione di cellule staminali somatiche.

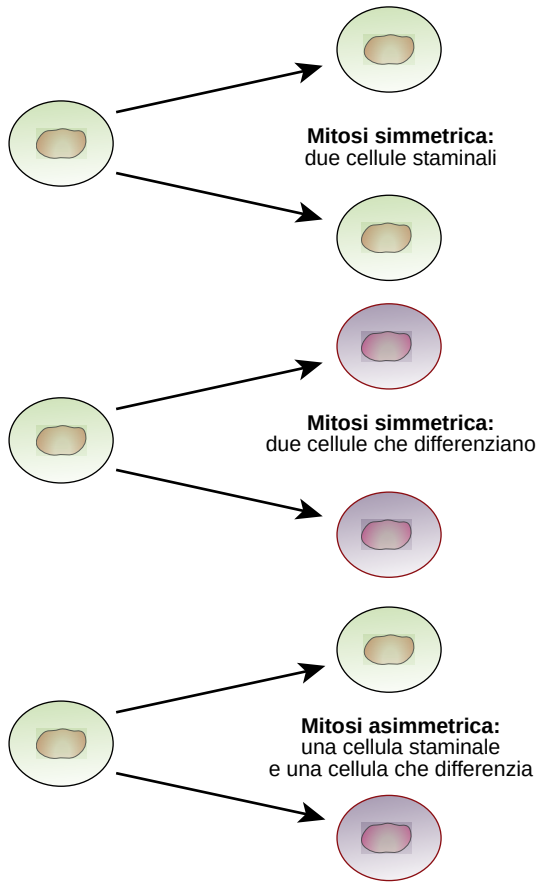



**Figura 4-6** ■ Rappresentazione schematica della modalità di divisione asimmetrica e simmetrica. Una cellula staminale (verde) può dare origine, mediante divisione simmetrica a due cellule figlie con le stesse potenzialità della cellula madre e quindi a due cellule staminali (verdi), oppure a due cellule figlie le quali entrambe entrano direttamente in un percorso differenziativo (viola). Una cellula staminale (verde), dividendosi in modo asimmetrico, genera una cellula figlia che rimane cellula staminale (verde) e una cellula figlia che differenzierà in un particolare tipo cellulare (viola).

## Meccanismi molecolari della divisione asimmetrica

Ad oggi non sono stati ancora completamente chiariti i meccanismi molecolari alla base della divisione asimmetrica, ma una serie di evidenze preliminari hanno indicato il coinvolgimento di specifiche vie di segnalazione, mediate dai fattori di crescita **Notch**, **WNT** (wingless integrated) e **Sonic hedgehog (SHH)**; quando deregolate, queste segnalazioni possono contribuire allo sviluppo e la crescita di tumori tra cui il carcinoma del colon e i tumori epidermici (WNT), medulloblastoma, carcinoma basocellulare (SHH) e leucemia delle cellule T (Notch). Fondamentalmente, due principali tipi di meccanismi sembrano governare la divisione asimmetrica delle cellule staminali. Il primo si basa sulla ripartizione asimmetrica di alcuni componenti cellulari in grado di determinarne il destino della cellula; tale meccanismo è indicato come "intrinseco"; il secondo meccanismo riguarda la posizione che assumono le cellule figlie rispetto a degli stimoli esterni; tale meccanismo, indicato come "estrinseco", si basa sul fatto che il piano di divisione della cellula staminale madre può posizionare una cellula figlia, quella che resta staminale, a rimanere all'interno della

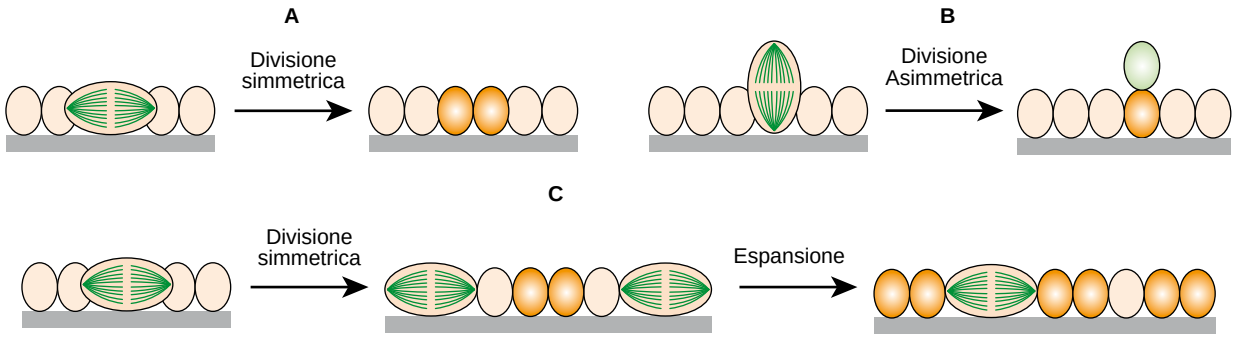



**FIGURA 4-7** ■ Le cellule staminali possono utilizzare facoltativamente divisioni sia simmetriche che asimmetriche. *A)* Una divisione nel piano dell'epitelio genera due cellule figlie morfologicamente simili che con molta probabilità hanno entrambe le caratteristiche di cellule staminali (arancione). La spessa linea grigia, definisce la membrana basale. *B)* Una divisione perpendicolare al piano dell'epitelio genera una cellula figlia staminale e una cellula figlia differenziata (verde). Si pensa che tali divisioni asimmetriche siano predominanti nella fase finale dello sviluppo fetale e nell'età adulta a livello delle cellule dello strato basale degli epiteli e nella zona ventricolare del cervello. *C)* Durante lo sviluppo, divisioni simmetriche espandono la popolazione di cellule staminali.

nicchia e l'altra, quella destinata a differenziare, fuori della nicchia. I meccanismi intrinseci comprendono l'assemblaggio regolato di **fattori della polarità cellulare** (Fig. 4-8A) e la segregazione regolata dei **determinanti il destino cellulare** (Fig. 4-8B). Qualora l'unica differenza tra le cellule figlie sia la loro posizione rispetto alla nicchia delle cellule staminali (Fig. 4-8C), le cellule figlie possono avere inizialmente un equivalente potenziale di sviluppo, ma acquisiscono un destino diverso a seconda della diversa esposizione ai segnali esterni.

Evidenze sperimentali hanno chiarito che la divisione cellulare asimmetrica si realizza in quattro passaggi consecutivi, che possono includere tutti i meccanismi molecolari descritti sopra. Primo, alcuni fattori possono essere delocalizzati nella cellula madre, ad esempio a seguito di segnali provenienti da una cellula vicina (Fig. 4-9A). In secondo luogo, la cellula madre diventa polarizzata, cosa che comporta la riorganizzazione del citoscheletro (Fig. 4-9B). In terzo luogo, fattori determinanti del destino cellulare sono segregati verso specifiche regioni della cellula madre polarizzata (Fig. 4-9C). Infine, il fuso mitotico è allineato in modo tale che il clivaggio ripartisce in modo diseguale i vari fattori (segnali di polarità e determinanti del destino differenziativo) tra le cellule figlie (Fig. 4-9D). Il risultato della divisione asimmetrica è la generazione di due cellule figlie con caratteristiche differenziative e spesso dimensioni diverse. Uno dei determinanti differenziativi che gioca un ruolo chiave nella divisione asimmetrica è la proteina **Numb**, che antagonizza la segnalazione di Notch coinvolto nella proliferazione delle cellule staminali e nel loro mantenimento. La segregazione e l'attivazione di Numb in una delle due cellule figlie spinge verso il differenziamento cellulare, mentre la cellula che non esprime Numb mantiene le potenzialità di cellula staminale. Analogamente, la segregazione del fattore di trascrizione **TLX** (tailless) è

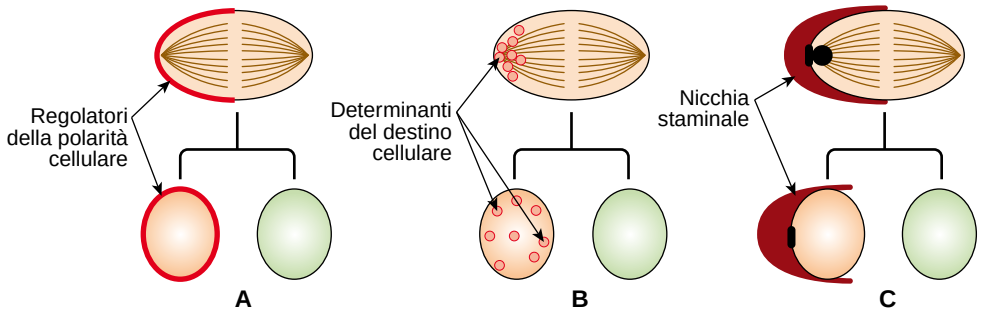



**FIGURA 4-8** ■ Rappresentazione schematica dei potenziali meccanismi che regolano la divisione asimmetrica. *A)* La localizzazione asimmetrica dei regolatori della polarità cellulare (in rosso) induce la divisione asimmetrica. Le cellule staminali sono rappresentate in arancione, mentre le cellule destinate a differenziare in verde. *B)* Determinanti del destino cellulare (in rosso) possono essere segregati nel citoplasma (oppure associati con la membrana, il centrosoma o qualsiasi altro costituente cellulare) di una delle due cellule figlie. *C)* L'orientamento controllato del fuso mitotico mantiene soltanto una cellula figlia nella nicchia staminale (in rosso), in modo che solo questa cellula figlia abbia accesso ai segnali estrinseci necessari per mantenere l'identità di cellula staminale. Questo meccanismo ha come risultato una divisione asimmetrica anche se la divisione è intrinsecamente simmetrica.

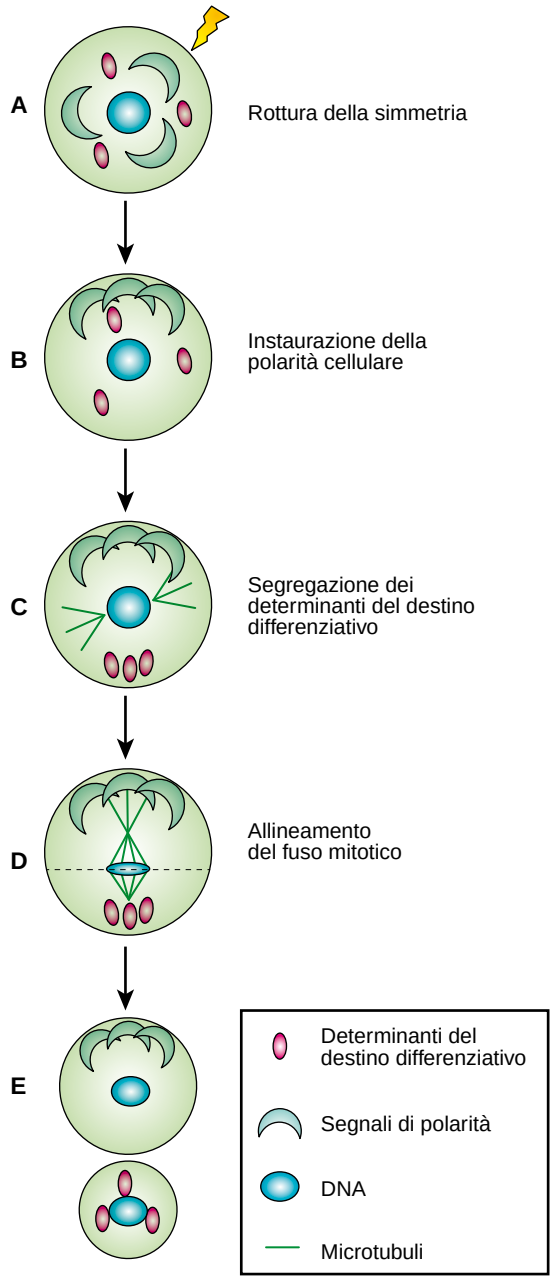



**Figura 4-9** ■ Rappresentazione schematica delle varie fasi che caratterizzano una divisione cellulare asimmetrica (vedere testo per i dettagli).

determinante per regolare il *self renewal* e la proliferazione delle cellule staminali neurali nel cervello adulto.

Un fattore importante per il destino differenziativo di una cellula staminale germinale in alcune specie animali, ma non nei mammiferi, sono i **determinati Keimbahn** (vedi Capitolo 9), che vengono espressi nella cellula figlia che rimane cellula germinale primordiale (PGC), mentre l'altra cellula figlia, in cui Keimbahn è assente, diventa cellula somatica.

Recenti evidenze sperimentali suggeriscono anche un ruolo importante della proteina onco-soppressore **p53** nella regolazione della divisione asimmetrica delle cellule staminali adulte. È stato dimostrato che cellule staminali in cui è stato eliminato il gene che codifica per p53 mostravano un aumento nella divisione simmetrica ed un comportamento simile a quello osservato nelle cellule staminali coinvolte in alcuni tipi di tumori (come ad esempio il carcinoma mammario). Infatti, la riattivazione farmacologica di p53 era sufficiente a ripristinare la divisione asimmetrica delle cellule staminali del tumore, riducendone la crescita.

## IL CONCETTO DI POTENZIALITÀ DIFFERENZIATIVA DELLE CELLULE STAMINALI

La cellula staminale unipotente è usualmente una staminale dei tessuti adulti e possiede delle capacità di differenziamento limitate, essendo capace di differenziare verso un'unica linea cellulare. Le cellule staminali della pelle, localizzate a livello dello strato basale dell'epidermide, rappresentano un tipo di cellule staminali unipotenti. Le cellule satelliti del muscolo scheletrico, localizzate tra la membrana basale e il sarcolemma delle fibre muscolari, rappresentano un altro tipo di cellule staminali unipotenti.

Le cellule staminali pluripotenti e multipotenti sono cellule in grado di differenziare in numerosi tipi cellulari. Descriveremo più avanti, in altri capitoli, le cellule dei tre **foglietti embrionali primari,** l'ectoderma, il mesoderma e l'endoderma, e delle **creste neurali**, queste sono tipici esempi di cellule staminali embrionali pluripotenti caratterizzate da una rapida proliferazione, ma da una capacità di *self renewal* limitata nel tempo. Cellule staminali multipotenti si trovano nell'adulto ed hanno la capacità di dare origine a diverse tipi cellulari all'interno di un singolo tessuto. Esempio tipico di cellule staminali multipotenti sono le **cellule staminali ematopoietiche**, che generano tutti i tipi di cellule mature del sangue, e le **cellule staminali mesenchimali** dei tessuti connettivi, che possono dare origine a vari tipi cellulari, quali gli elementi cellulari del tessuto connettivo propriamente detto (fibroblasti, adipociti, macrofagi), ai periciti, alle cellule muscolari lisce, ai condrociti della cartilagine e agli osteoblasti del tessuto osseo.

Il termine pluripotente si riferisce ad una cellula staminale in grado di dare origine a quasi tutti i tipi di cellule di un organismo. Le cellule della **massa cellulare interna** (inner cell mass, ICM) di una blastocisti sono considerate cellule staminali pluripotenti in quanto in grado di dare origine alle cellule dei tre i foglietti embrionali primari, ma non alle cellule del trofoblasto destinato a sua volta a dare origine a tessuti extraembrionali; come le cellule dei foglietti embrionali da esse derivate, le cellule dell'ICM sono dotate di una capacità di *self renewal* limitata nel tempo. Un altro esempio di cellule staminali pluripotenti sono le cellule ESC e EGC. Si tratta, come abbiamo accennato più sopra e come vedremo più avanti, di cellule staminali in un certo senso "artificiali" perché non esistono in natura, ma possono es-

sere prodotte in coltura rispettivamente a partire dalle cellule dell'ICM o dalle cellule germinali embrionali; le ESC e le EGC oltre che pluripotenti possiedono una spiccata capacità di *self renewal* che attraverso rapide divisioni simmetriche permette di generare in pochi giorni milioni di cellule staminali in una piastra di coltura.

Le uniche cellule che possono essere considerate staminali totipotenti, ovvero in grado di dare origine a qualsiasi tipo cellulare di un organismo, sono l'ovocito fecondato e i blastomeri che si formano a seguito delle prime divisioni dello stesso ovocito fecondato fino allo stadio di morula (vedi Capitolo 9). Si tratta naturalmente di cellule staminali molto particolari. Il citoplasma dell'ovocito per esempio è l'unico che possiede la capacità, ancora poco compresa, di "riprogrammare il genoma" di una cellula differenziata in modo che essa possa riacquisire una completa totipotenza differenziativa. Come vedremo nel Capitolo 9, questa capacità dell'ovocito è alla base di un metodo di clonazione. I blastomeri sono responsabili di un'altra modalità di clonazione per così dire "naturale" la generazione di gemelli monozigotici (vedi Capitoli 8 e 9). Difatti, fino a poco prima dello stadio di morula, ogni singolo blastomero anche se isolato dagli altri può generare un intero nuovo individuo. Va precisato che per l'ovocito non si può parlare di capacità di *self renewal*, mentre per i blastomeri questa capacità è limitata a pochi cicli cellulari.

Da ricordare che, come abbiamo riportato in un precedente paragrafo, la potenzialità differenziativa di una cellula staminale può cambiare a seconda della plasticità del suo genoma e del microambiente in cui essa si trova.

Per dimostrare la potenzialità differenziativa di una cellula staminale si utilizzano generalmente sia metodi in vitro che in vivo. In vitro, ovvero in coltura, si osserva, utilizzando vari parametri morfologici, molecolari e funzionali, quali tipi di cellule possono essere prodotte da una popolazione di cellule staminali quando esse vengono lasciate differenziare spontaneamente o indotte a differenziare mediante protocolli differenziativi (Fig. 4-10). In vivo, piccoli numeri di cellule staminali possono essere iniettati in una blastocisti di topo che, trapiantata nell'utero di una topolina opportunamente preparata (pseudo-gravida), va incontro ad uno sviluppo completo. Utilizzando opportuni marcatori morfologici e/o molecolari è possibile determinare il contributo che le cellule considerate staminali apportano ai vari tipi di tessuti dell'embrione e poi dell'individuo adulto; in aggiunta, la trasmissione di un marcatore delle cellule trapiantate alla progenie del topolino o della topolina nata dalla blastocisti iniettata indica che le cellule trapiantate sono differenziate anche in cellule germinali (vedi Capitolo 1).

## CELLULE STAMINALI EMBRIONALI

Come riferito nell'introduzione, una tappa fondamentale della storia delle cellule staminali è stato l'isolamento, nel 1998, delle cellule staminali embrionali da blastocisti umane, che faceva seguito agli studi pionieristici condotti sui teratocarcinomi e le ESC di topo. Nel loro insieme questi studi hanno messo a punto le metodologie che garantiscono l'isolamento e il mantenimento in coltura delle cellule staminali embrionali per tempi indefiniti e aperto la strada

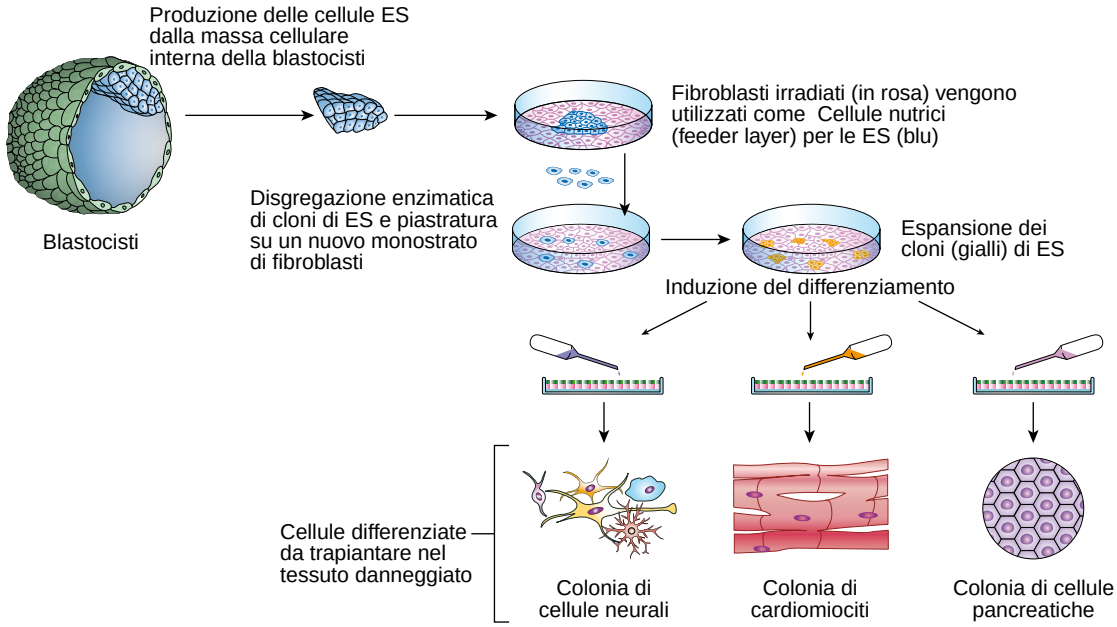



**FIGURA 4-10** ■ Rappresentazione schematica dell'isolamento e coltura di cellule staminali embrionali (cellule ES) dalla blastocisti. Le cellule ES possono essere indotte a differenziare mediante la rimozione di LIF dal mezzo di coltura. Inoltre l'aggiunta di specifici fattori differenziativi permette un maggior arricchimento di cloni di un particolare tipo cellulare. L'obiettivo finale è di trapiantare i cloni cellulari così ottenuti (ad esempio cardiomiociti, cellule pancreatiche, cellule neurali) in un paziente.

alla produzione di tessuti in coltura utilizzabili per numerosi fini terapeutici. Inoltre, sfruttando la possibilità di introdurre o eliminare geni nelle cellule staminali in coltura e la pluripotenza delle ESC trapiantate in blastocisti, alcuni scienziati hanno messo a punto metodi per introdurre geni (transgenesi, Ralph Brinster e Richard Palmiter, vedi Capitolo 1), o eliminare geni in animali da esperimento (*gene targeting*, Mario Capecchi, Martin Evans e Oliver Smithies, premi Nobel 2006 per la Medicina).

In breve, se le cellule dell'ICM di una blastocisti vengono isolate e disgregate in piccoli gruppi, e questi vengono poi seminati su un monostrato di fibroblasti precedentemente preparato in coltura, dopo circa 5-7 giorni cominciano ad apparire piccoli cloni di cellule ES (Fig. 4-10). Questi vengono successivamente disgregati enzimaticamente e di nuovo coltivati su monostrati di fibroblasti, che forniscono fattori di crescita necessari al mantenimento dello stato staminale delle cellule; dopo pochi giorni si formeranno nuove colonie che potranno essere di nuovo disgregate e "passate" su un altro monostrato di cellule; i passaggi possono essere ripetuti per mesi o anni. Le colonie di ESC possono venire congelate, per essere poi scongelate anche a grande distanza di tempo, e di nuovo coltivate per altri passaggi.

Si è dimostrato che per mantenere una cellula staminale embrionale nel suo stato indifferenziato è necessario che essa esprima fattori trascrizionali, quali **OCT4** (octamen-binding transcription-factor 4) e **Nanog (**dal celtico *Tir Nan Og*, cioè "terra dell'eterna giovinezza"), e sia costantemente presente nel mezzo di coltura la citochina **LIF** (leukemia inhibitory factor) nel topo o il fattore di crescita **FGF** (fibroblast growth factor) nell'uomo. Si ritiene che i meccanismi molecolari che determinano la formazione e il mantenimento delle ESC in coltura siano essenzialmente due: a) la capacità di molecole come il LIF e l'FGF di mantenere elevata l'espressione di geni chiamati "della staminalità", come appunto *Oct4* e *Nanog*, che orchestrano a loro volta l'espressione di una serie di altri geni in grado di garantire il mantenimento della pluripotenza tipica delle cellule dell'ICM e, b) l'attivazione di segnali di proliferazione e di inibizione della morte cellulare programmata da parte di altri fattori non ancora identificati che assicurano il *self renewal* illimitato di queste cellule. È come se lo stato di pluripotenza e di *self renewal* delle cellule dell'ICM, destinato a perdersi in vivo dopo alcuni cicli cellulari, venisse "cristallizzato" dalle condizioni di coltura. Di fatto la semplice rimozione del LIF e dell'FGF dal mezzo di coltura è sufficiente a deregolare l'espressione di *Oct4* e delle proteine del circuito di Nanog e a spingere il differenziamento spontaneo delle cellule staminali embrionali verso tutte le linee cellulari che derivano dai tre foglietti embrionali primari, ectoderma, mesoderma ed endoderma (Fig. 4-10). Recenti sperimentazioni indicano che le ESC possono generare addirittura cellule germinali maschili e femminili in coltura (vedi Capitolo 9).

Una delle sfide più importanti della biologia delle ESC è la caratterizzazione di segnali induttivi che le spingano a differenziare non in modo casuale, ma verso una specifica linea cellulare. A tale scopo, diversi gruppi di ricerca hanno dimostrato che questi segnali sono costituiti da combinazioni di più fattori di crescita. È stato ad esempio dimostrato che il trattamento di colture ESC con l'aggiunta sequenziale di fattori di crescita come FGF2, EGF e PDGF (platelet-derived growth factor) stimola il differenziamento delle ESC verso cellule della nevroglia (astrociti e oligondendrociti).

L'impiego delle ESC umane nella ricerca e nella pratica clinica pone, tuttavia una serie di problematiche sia etiche che pratiche. Il problema etico è quello della necessità di utilizzare embrioni umani per ottenere le cellule dell'ICM da una blastocisti; se la blastociti viene considerata già un individuo a tutti gli effetti nasce il problema etico. Le problematiche pratiche ancora da risolvere sono essenzialmente due. La prima deriva dal fatto che ESC iniettate in un individuo adulto possono generare tumori, la seconda è che i tessuti derivati dalle ESC verrebbero rigettati a seguito di una reazione immunitaria da parte dell'individuo ospite. Le ricerche che erano in corso per l'utilizzo delle ESC in diversi settori della biomedicina, di cui alcuni esempi come la clonazione terapeutica e la terapia genica sono illustrati nella Figura 4-11, si trovano attualmente in una fase di stallo sia per le limitazioni che alcune nazioni tra cui l'Italia (vedi la legge 40 del 2004, Capitolo 9), hanno imposto agli studi sulle cellule staminali embrionali umane sia soprattutto a seguito delle recenti straordinarie sperimentazioni che hanno portato alla produzione di un nuovo tipo di cellule staminali "artificiali" chiamate **cellule staminali pluripotenti indotte (induced pluripotent stem cells, iPSC)** che sembra possano risolvere gran parte dei problemi sopra menzionati e di cui parleremo alla fine di questo capitolo.

## CELLULE STAMINALI ADULTE

L'ambizione di indurre la rigenerazione tissutale in un organismo adulto si è riaccesa nell'ultimo decennio grazie ad importanti scoperte che hanno evidenziato la presenza di cellule staminali in ogni organo e tessuto adulto, capaci di rispondere a stimoli rigenerativi. Per inciso diremo che l'origine di queste staminali è avvolta ancora nel più completo mistero.

Fino agli anni cinquanta del secolo scorso i tessuti erano classificati in labili e stabili sulla base delle osservazioni di Giulio Bizzozero, forse, assieme al suo allievo Camillo Golgi, il più importante istologo e anche igienista italiano dell'800. Bizzozero aveva notato che alcune cellule dell'organismo, quali i globuli rossi, gli spermatozoi, i cheratinociti, erano rimpiazzate continuamente (cellule/*tessuti labili*), mentre le cellule dei muscoli scheletrici, del cuore e del cervello (*tessuti perenni*) erano incapaci di rinnovamento e riparo. Tra queste due categorie erano posti da Bizzozero i *tessuti stabili*, formati da elementi che normalmente non vengono sostituiti, ma possono esserlo, se e quando necessario, perché in essi è presente una riserva di elementi giovani capaci di proliferare e rimpiazzare le cellule danneggiate (fegato, cellule muscolari lisce, tessuto osseo). Oggi invece sappiamo per certo che non esistono "tessuti perenni" e che ogni tessuto adulto dell'organismo, incluso il tessuto nervoso,

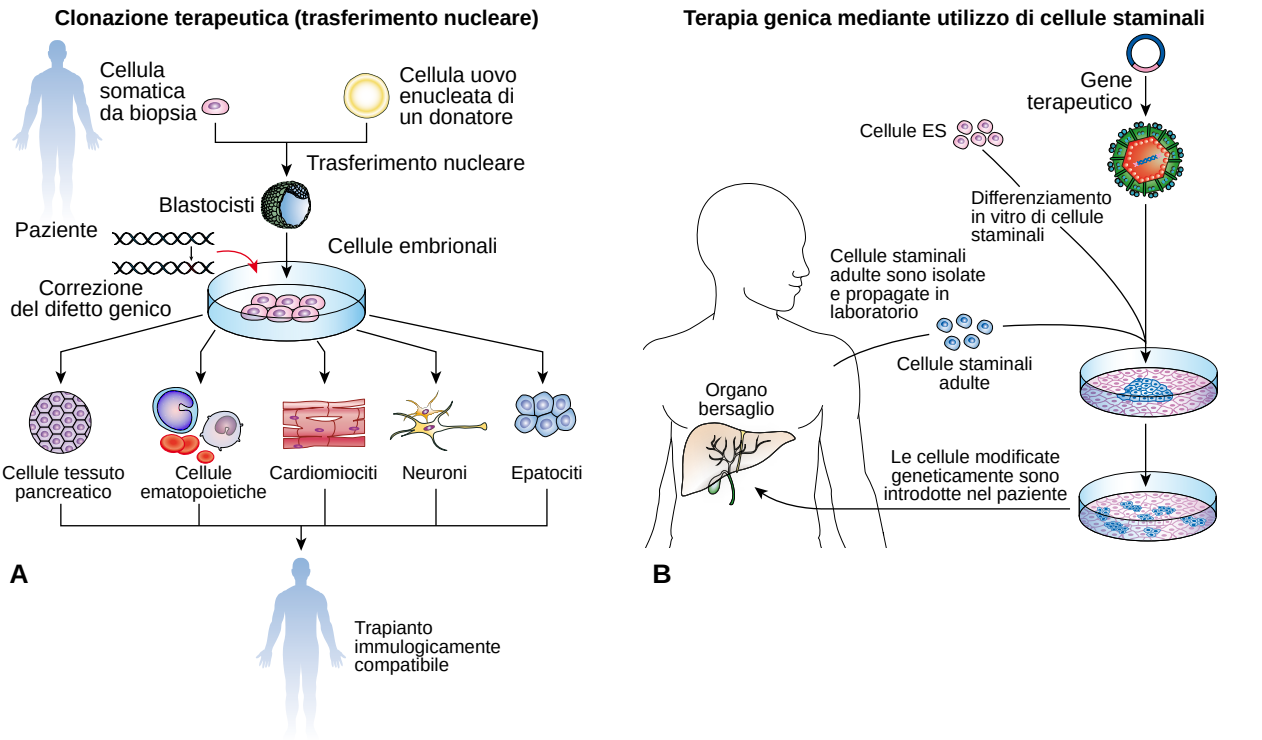



**FIGURA 4-11** ■ *A)* Rappresentazione schematica di clonazione terapeutica (o più propriamente trasferimento nucleare). La tecnica consiste nell'estrarre il nucleo da una cellula somatica di un paziente e impiantarlo in un ovocita privato del suo nucleo. L'ovocita viene quindi indotto a dividersi e a formare una blastocisti, da cui si producono le cellule staminali embrionali (ES). Le ES verranno poi coltivate in vitro e corretto l'eventuale difetto genico. Le ES, corrette geneticamente, verranno indotte a differenziare in diversi tipi cellulari, i quali potranno poi esser impiantati nel paziente. *B)* Rappresentazione schematica di un approccio di terapia genica mediante utilizzo di cellule staminali. Le cellule ES ottenute mediante la tecnica del trasferimento nucleare, descritta nella figura *A*, oppure cellule staminali adulte del paziente vengono isolate, coltivate *in vitro* e corrette geneticamente mediante infezione con un virus "terapeutico" che veicola il gene terapeutico e infine re-introdotte nel paziente stesso.

possiede un suo compartimento di cellule staminali in grado di attivarsi, più o meno efficientemente, in seguito a diversi stimoli induttivi, sfatando uno dei vecchi dogmi della neurobiologia che sosteneva come si possano perdere neuroni, ma non acquisirne di nuovi. Grazie agli studi pionieristici di Joseph Altman, che nel 1965 per primo descrisse la presenza di cellule proliferanti nel cervello adulto, e successivamente alle ricerche di Samuel Weiss e Brent Reynolds degli anni novanta, che isolarono le cellule staminali neurali, oggi sappiamo esistere una neurogenesi se pur limitata a certi tipi di neuroni anche nel cervello adulto. Infatti, sono state descritte due regioni particolarmente attive nel cervello adulto, che sono la regione dell'ippocampo e la regione sub-ventricolare dei ventricoli laterali, dove vengono continuamente generati nuovi neuroni dello stesso ippocampo o del bulbo olfattivo. Analogamente, agli inizi degli anni 2000, sono state isolate e parzialmente caratterizzate cellule staminali cardiache nel cuore adulto. Ci sono evidenze sperimentali che dimostrano che i cardiomiociti si rinnovano continuamente nel corso di tutta la vita di un individuo. Come accennato in precedenza, si può assumere che le caratteristiche funzionali distintive delle cellule staminali adulte siano la divisione asimmetrica, la capacità clonogenica e il basso grado proliferativo. Inoltre, molte delle cellule staminali adulte che mostrano capacità differenziative limitate finché si trovano all'interno della loro nicchia, in particolari condizioni manifestano una sorprendente capacità di differenziarsi in tipi cellulari diversi. Questo fenomeno è a volte indicato come trans-differenziamento, che indica la capacità di una cellula staminale di acquisire una più ampia potenzialità di sviluppo (Fig. 4-2). In ogni modo, una cellula staminale deve essere potenzialmente in grado di contribuire in modo determinante e significativo al recupero strutturale e funzionale di un tessuto danneggiato o malato. Questi requisiti sono posseduti dalle **cellule staminali ematopoietiche** (**ematopoietic stem cells, HSC** o **P-(pluripotent)-HSC**, vedi Capitolo 17). Fin dalla fine degli anni '50 gli scienziati avevano notato che trapianti di cellule del midollo osseo e della milza potevano ristabilire la piena funzionalità del sistema ematopoietico di individui che erano stati esposti a pesanti dosi di radiazioni. Agli inizi degli anni '60, Ernest McCulloch e James Till iniziarono una serie di esperimenti che consistevano nell'iniettare cellule del midollo osseo in topi irradiati. Essi osservarono che nella milza di questi animali si formavano noduli visibili ad occhio nudo in numero proporzionale a quello delle cellule di midollo iniettate (Fig. 4-12). I noduli contenevano diversi tipi di

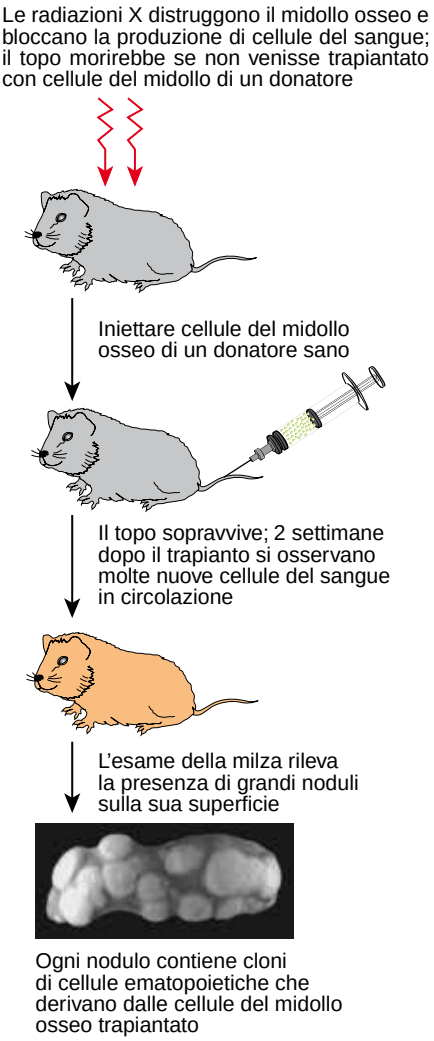



**Figura 4-12** ■ Rappresentazione schematica dell'esperimento di trapianto di cellule staminali ematopoietiche in un topo ricevente il cui midollo osseo endogeno è stato distrutto mediante irraggiamento. Le cellule staminali ematopoietiche presenti nel midollo trapiantato sono in grado di ricostituire l'intero midollo osseo danneggiato, di migrare e di dare origine a cloni di cellule ematopoietiche all'interno della milza del topo ricevente.

cellule in differenziamento e differenziate del sangue; negli animali trapiantati si ristabiliva un'emopoiesi normale ed essi, a differenza dei controlli non trapiantati, sopravvivevano. I due ricercatori specularono che ciascun nodulo originasse da una singola cellula del midollo osseo trapiantato, probabilmente una cellula staminale. In successive ricerche essi furono in grado di confermare questa ipotesi e dimostrarono anche che le cellule che davano origine ai noduli possedevano la capacità *self renewal*: si trattava in sostanza delle cellule staminali ematopoietiche. Oggi il trapianto di midollo è l'applicazione clinica più comune delle cellule staminali e viene utilizzata per curare leucemie e linfomi.

Nel 1999 venne riportato che se **topi mdx** (portatori di una mutazione genica simile a quella che nell'uomo causa la distrofia muscolare di Duchenne) venivano irradiati e poi trapiantati con cellule di midollo osseo, in essi veniva non solo ricostituito il compartimento staminale ematopoietico, ma veniva anche parzialmente ristabilita l'espressione corretta della distrofina nei loro muscoli. Inoltre, nelle fibre muscolari dei topi mdx furono osservati nuclei delle cellule del donatore, suggerendo che il midollo osseo conteneva cellule in grado di differenziare anche in cellule dei muscoli scheletrici. Qualche anno più tardi, tuttavia, un altro gruppo di ricerca smorzava gli entusiasmi suscitati da queste ricerche dimostrando che questa metodologia non era in grado di curare la distrofia muscolare, giacché solo l'1% delle fibre muscolari di un muscolo risultava positivo per la corretta distrofina, un numero troppo esiguo per garantire un miglioramento funzionale significativo del topo distrofico.

Un altro problema importante da tenere in considerazione non è solo la disponibilità di cellule staminali, ma anche i segnali di nicchia che le staminali devono ricevere per poter funzionare al meglio (vedi Fig. 4-2). È paradigmatica l'osservazione che muscoli di topi vecchi esposti ad un ambiente giovane sono in grado di ripristinare i normali processi rigenerativi, normalmente compromessi dall'invecchiamento. Per molti anni si è pensato che una delle limitazioni alla rigenerazione e riparo di un tessuto vecchio o malato dipendesse esclusivamente dalla progressiva riduzione di numero delle cellule staminali. Si è osservato invece che in diverse condizioni patologiche, come l'infarto del miocardio, l'ischemia cerebrale, le distrofie muscolari, si crea un microambiente ostile che compromette il corretto funzionamento delle cellule staminali (Fig. 4-13).

Nonostante questi insuccessi, come discuteremo nell'ultimo paragrafo, la possibilità di utilizzare cellule staminali di diversa origine ed in particolare dei tessuti adulti per migliorare o guarire numerose patologie degenerative rimane un obiettivo raggiungibile.

A conclusione di questo paragrafo diremo che recentemente in alcuni esperimenti di trapianto di cellule staminali è stata messa in evidenza un'altra importante caratteristica che può essere presente in alcuni tipi di cellule staminali dei tessuti adulti; la **capacità di migrare** e **accasarsi** (il termine inglese è *homing*) in nicchie diverse da quelle originarie. Possiamo quindi immaginare che esista una sorta di autostrada delle cellule staminali (Fig. 4-14), dove le staminali adulte migrano, attraverso la circolazione sanguigna, e raggiungono diversi tessuti quando richiamate in seguito ad un danno o ad altri segnali di *homing*.

## CELLULE STAMINALI PLURIPOTENTI INDOTTE (INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS, iPS)

Nel 2006 un gruppo di ricercatori giapponesi diretto da Shinya Yamanaka (premio Nobel per la Medicina nel 2012), introducendo in fibroblasti prelevati da topi adulti mediante vettori virali quattro geni espressi a livelli elevati nelle ESC, *Oct4*, *Sox2 (SRX-box2)*, *c-Myc (myelocytomatosis)*, e *Klf4 (Kruppel-like factor 4)*, riuscì ad ottenere in coltura colonie di cellule molto simili se non

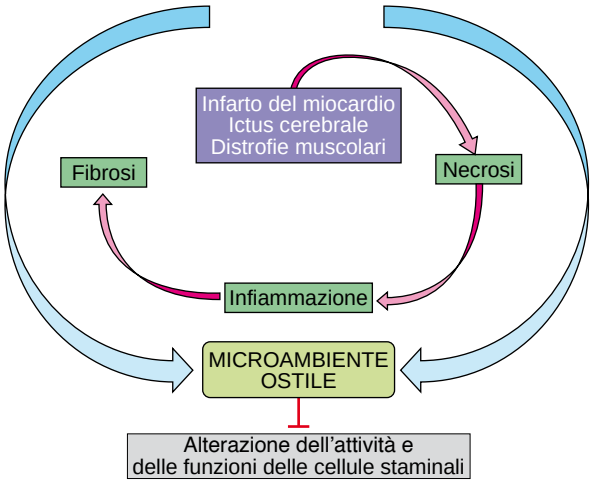



**Figura 4-13** ■ Rappresentazione schematica di come in determinate condizioni patologiche, come infarto del miocardio, ictus cerebrale, distrofie muscolari, si possa creare un microambiente ostile, determinato da un aumento dei processi di necrosi, da un'infiammazione cronica e da accumulo di tessuto fibrotico, che promuove un'alterazione dell'attività e del differenziamento fisiologico delle cellule staminali.

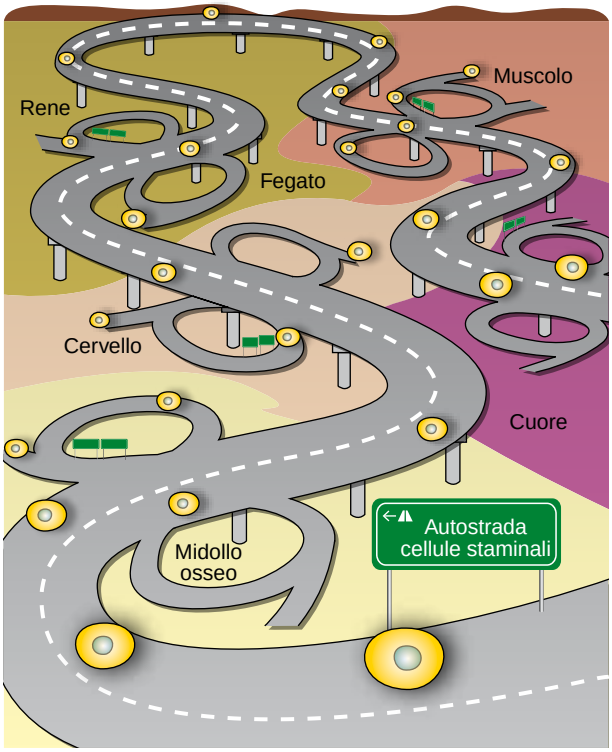



**Figura 4-14** ■ Rappresentazione schematica di come le cellule staminali possano migrare e raggiungere i diversi distretti tissutali quando richiamate da opportuni stimoli di "homing" (accasamento), come ad esempio in seguito ad un danno.

identiche alla colonie di ESC ottenute dalle blastocisti; queste cellule sono state pertanto definite **cellule staminali pluripotenti indotte (iPS)** (Fig. 4-15). In successivi esperimenti, si dimostrò che le iPS iniettate in una blastocisti erano capaci di differenziare in qualsiasi tipo di cellule comprese le cellule germinali, rafforzando l'idea di aver prodotto delle vere cellule staminali pluripotenti.

Questo risultato straordinario ottenuto grazie a quasi 50 anni di studi sulle cellule staminali e germinali embrionali, dimostrava che anche cellule terminalmente differenziate potevano essere indotte a "riprogrammare" il loro genoma in modo tale da riguadagnare una plasticità di differenziamento simile a quella di una cellula embrionale e germinale. Inoltre permetteva di superare i problemi etici e di rigetto che abbiamo sopra descritto per le ESC. Numerose ricerche sono ancora in corso soprattutto per capire il meccanismo della riprogrammazione, aumentare l'efficienza del processo di riprogrammazione genomica (nei primi esperimenti dell'ordine dello 0,1-1%), ed eliminare la necessità di utilizzare vettori virali potenzialmente pericolosi.

Le potenzialità terapeutiche delle iPS sono ovviamente enormi, soprattutto per quelle patologie degenerative particolarmente difficili da trattare con le terapie convenzionali e con le cellule staminali adulte, come la malattia di Parkinson, le distrofie muscolari, il diabete e altre. Inoltre tali cellule eliminerebbero il problema di essere rigettate dopo eventuale trapianto, essendo generate direttamente dalle cellule somatiche del paziente stesso. Ad esempio, si può pensare di generare cellule iPS da fibroblasti di pazienti con patologie genetiche e/o degenerative, correggere in vitro l'eventuale difetto genico, indirizzare poi le iPS verso il tipo cellulare di cui si necessita (neuroni, cellule muscolari, cellule beta del pancreas e così via) e trapiantare poi tali cellule nel paziente (Fig. 4-16). Cellule iPS ottenute da fibroblasti, fatte opportunamente differenziare, sono state usate con successo nel topo e nel ratto per curare l'anemia falciforme e la malattia di Parkinson. Tuttavia, ad oggi anche l'utilizzo delle iPS pone dei problemi pratici. Uno dei processi più importanti e critici dello sviluppo embrionale è l'*imprinting* genomico di cui si parlerà in alcuni dei capitoli seguenti. Si tratta di modificazioni epigenetiche del DNA, principalmente metilazioni in citosina, essenziali per un corretto sviluppo embrionale e postnatale. È stato recentemente dimostrato che le iPS mostrano errori nella metilazione del DNA. Questo suggerisce che il sistema di riprogrammazione del genoma che avviene in queste cellule in coltura con gli attuali metodi sia ancora imperfetto. Un altro problema, emerso negli ultimi anni, è l'osservazione che le iPS ottenute riprogrammando cellule adulte sono geneticamente instabili, al punto che possono generare tumori.

## SUCCESSI E PROSPETTIVE PER L'UTILIZZO DELLE CELLULE STAMINALI NELLA PRATICA CLINICA

La medicina rigenerativa è una delle nuove frontiere della medicina ed ha l'obiettivo di utilizzare le cellule staminali per riparare o ricostruire tessuti danneggiati. Come abbiamo discusso nei paragrafi precedenti, l'idea di riparare un tessuto danneggiato mediante un tra-

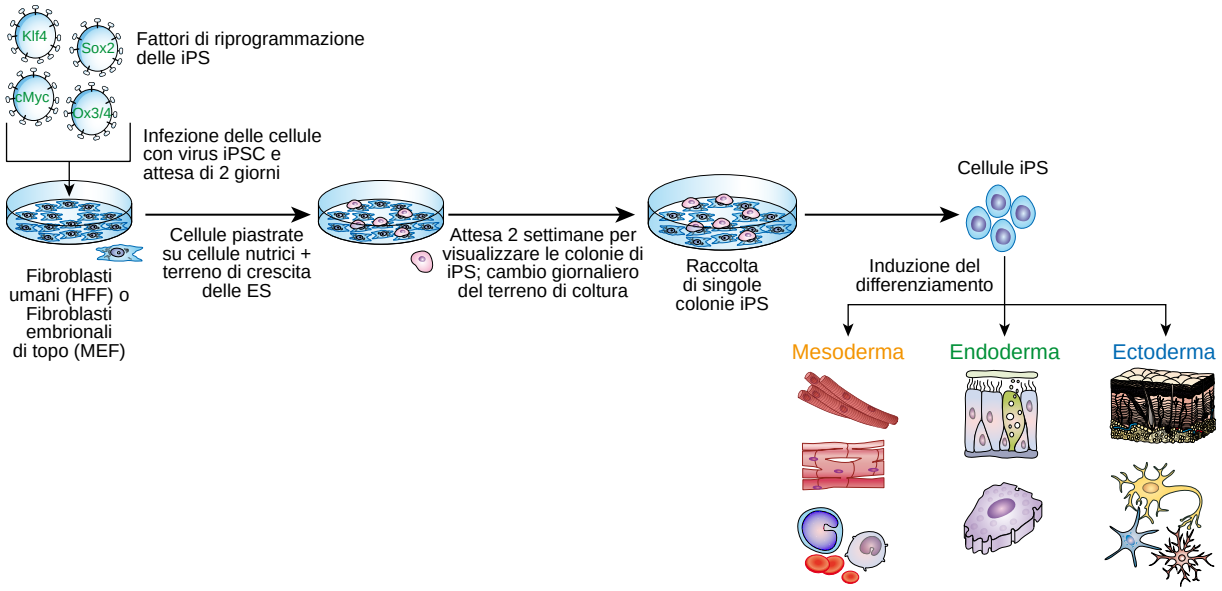



**Figura 4-15** ■ Rappresentazione schematica delle diverse fasi che portano alla generazione delle cellule staminali pluripotenti indotte (iPS) partendo da fibroblasti o altre cellule somatiche del corpo. Tali cellule somatiche possono essere riprogrammate al destino pluripotente trasducendo, ad esempio mediante infezione virale, i geni chiave delle cellule staminali embrionali, quali Oct-4, Sox2, c-Myc, e Klf4. Dopo diversi passaggi in coltura è possibile isolare le colonie di cellule iPS, le quali, analogamente alle cellule ES, possono dare origine a popolazioni cellulari appartenenti ai tre foglietti germinativi: mesoderma (es. fibrocellule muscolari scheletriche, cardiomiociti, cellule del sangue), endoderma (es. cellule polmonari, cellule beta del pancreas) ed ectoderma (es. cheratinociti, neuroni e cellule della glia).

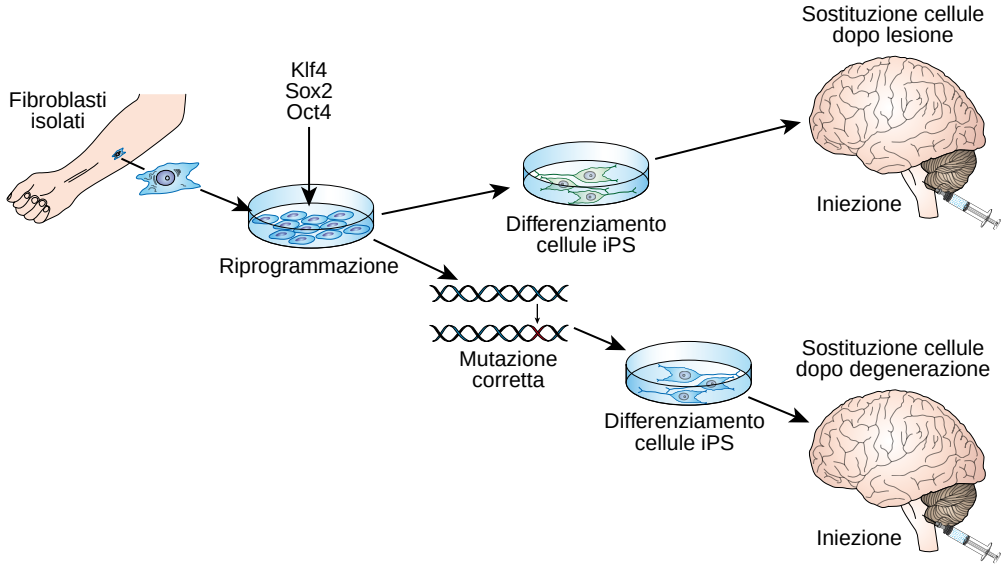



**Figura 4-16** ■ Approccio terapeutico mediante utilizzo delle iPS. Le iPS possono essere generate dai fibroblasti di un paziente che ha necessità di rimpiazzare delle popolazioni cellulari in seguito ad un danno (per esempio ischemia cerebrale) o a causa di patologie degenerative. In questo caso la tecnologia delle iPS offre anche la possibilità di correggere l'eventuale difetto genetico prima di essere trapiantate nel paziente.

pianto di cellule sane si concretizza verso la fine degli anni cinquanta con il trapianto di midollo osseo. Ad oggi, la tecnica del trapianto di midollo e di cellule staminali ematopoietiche è entrata nella pratica clinica per curare diverse patologie del sangue, abitualmente mortali in passato, come la leucemia acuta mieloide e linfoide, la leucemia cronica mieloide, le sindromi mielodisplastiche e i disordini linfoproliferativi, che possono essere curate e addirittura guarite in una percentuale variabile dal 30% al 90% a seconda del tipo di malattia e

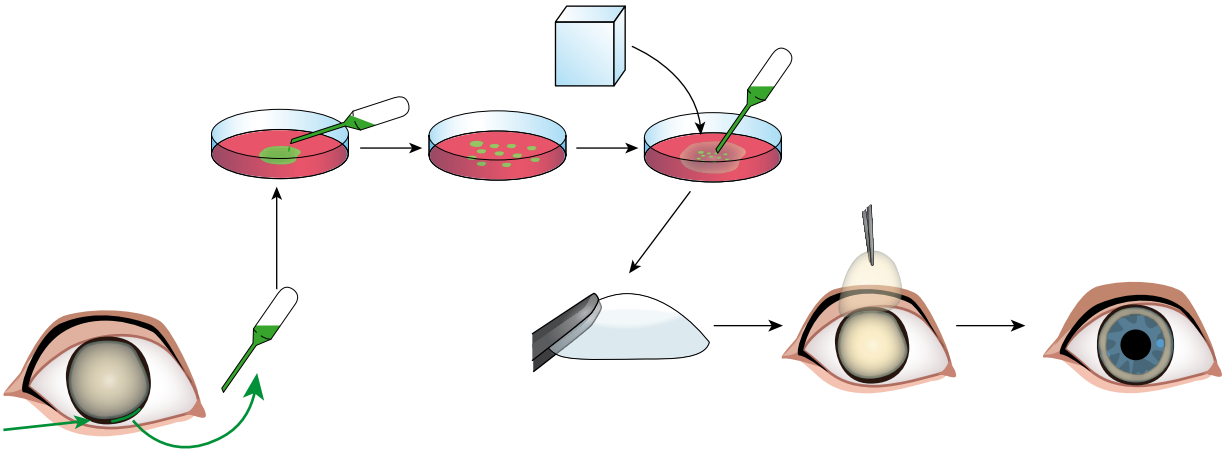


**FIGURA 4-17** ■ Terapia cellulare, mediante utilizzo di cellule staminali per curare lesioni corneali. Cellule staminali vengono prelevate direttamente dall'imbus, una zona della cornea facilmente accessibile attraverso un semplice prelievo di 1-2 millimetri (freccia) in anestesia locale. Le cellule prelevate vengono coltivate in vitro per formare un epitelio corneale che verrà trapiantato nei pazienti. In assenza di altre patologie, i pazienti normalmente recuperano completamente e stabilmente la vista.

dell'età del paziente. Inoltre, utilizzando un approccio combinato di terapia cellulare e di terapia genica con il trapianto di midollo osseo è stato possibile curare una grave forma di immunodeficienza congenita (ADA-SCID). L'approccio combinato consiste nel prelevare cellule staminali dal paziente, coltivarle in vitro e correggerle geneticamente, per poi reimpiantarle nel paziente stesso. È stato dimostrato che è sufficiente una sola infusione di cellule staminali del midollo osseo, preventivamente corrette con la terapia genica, per ripristinare nei bambini un sistema immunitario perfettamente funzionante.

Sarebbe troppo lungo riportare in questa sede le sperimentazioni in corso in tutto il mondo sull'utilizzo delle cellule staminali di origine diversa per la cura di svariate patologie, né i tanti insuccessi e qualche promettente successo ottenuto quasi sempre in animali da esperimento, come il recupero parziale della contrattilità del cuore dopo un infarto o dei movimenti in paralisi spinali. Vogliamo però citare alcuni risultati particolarmente brillanti ottenuti in Italia per trattare e curare lesioni epiteliali, quali ustioni della pelle e danni dell'epitelio corneale nell'uomo. Grazie agli studi di Michele De Luca e Graziella Pellegrini pubblicati alla fine degli anni '90, è possibile oggi generare in laboratorio una cornea partendo da cellule staminali epiteliali isolate dalla regione limbale dell'occhio del paziente stesso ed utilizzarla per sostituire una cornea compromessa da un'ustione o danneggiata da un'infezione (Fig. 4-17). Lo stesso gruppo di ricerca, utilizzando l'approccio combinato di terapia cellulare e genica ha iniziato una sperimentazione clinica per trattare malattie della pelle come l'epidermolisi bollosa, una malattia genetica caratterizzata da un progressivo scollamento dello strato superficiale, l'epidermide, da quello più profondo, il derma.

Nonostante gli enormi progressi compiuti dagli studi sulle cellule staminali, la medicina rigenerativa basata sul loro impiego, salvo le poche eccezioni citate, è solo agli albori e molta strada deve essere ancora percorsa per migliorare le conoscenze sulla biologia di queste affascinanti cellule e le metodologie attualmente a disposizione prima che essa entri a buon diritto nella pratica clinica.

## Letture consigliate

Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? Cell 105, 829-841, 2001.

Carlson BM. Some principles of regeneration in mammalian systems. Anat Rec B New Anat 287, 4-13, 2005.

Carosio S, Berardinelli MG, Aucello M, Musarò A. Impact of ageing on muscle cell regeneration. Ageing Res Rev 10, 35-42, 2011.

Chang HY, Cotsarelis G. Turning skin into embryonic stem cells. Nat Med 13, 783-784, 2007.

Chien KR. Stem cells: lost in translation. Nature 428, 607-608, 2004.

Cicalese A, Bonizzi G, Pasi CE, Faretta M, Ronzoni S, Giulini B, Brisken C, Minucci S, Di Fiore PP, Pelicci PG. The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells. Cell 138, 1083-1095, 2009.

Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weissman IL, Rando TA. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. Nature 433, 760-764, 2005.

Conti L, Cattaneo E. Il punto sulle staminali. Le Scienze 523, 45-51, 2011.

Dirks PB. Cancer: stem cells and brain tumours. Nature 444, 687-688, 2006.

Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. Science 279, 1528-1530, 1998.

Ferrari G, Stornaiuolo A, Mavilio F. Failure to correct murine muscular dystrophy. Nature 411, 1014-1015, 2001.

Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. Cell 100, 143-155, 2000.

Fujisawa T. Hydra regeneration and epitheliopeptides. Dev Dyn 226, 182-189, 2003.

Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. Nature 401, 390-394, 1999.

Hochedlinger K, Jaenisch R. Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. N Engl J Med 349, 275-286, 2003.

Huntly BJ, Gilliland DG. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. Nat Rev Cancer 5, 311-321, 2005.

Huttmann A, Li CL, Duhrsen U. Bone marrow-derived stem cells and "plasticity". Ann Hematol 82, 599-604, 2003.

Kokaia Z, Lindvall O. Neurogenesis after ischaemic brain insults. Curr Opin Neurobiol 13, 127-132, 2003.

Korbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair – a new therapeutic concept? N Engl J Med 349, 570-582, 2003.

Lanza R, Rosenthal N. The stem cell challenge. Sci Am 290, 92-99, 2004.

Mooney DJ, Mikos AG. Growing new organs. Sci Am 280, 60-65, 1999.

Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. Nature 441, 1068-1074, 2006.

Musarò A, McCullagh K, Paul A, Houghton L, Dobrowolny G, Molinaro M, Barton ER, Sweeney HL, Rosenthal N. Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. Nature Genetics 27, 195-200, 2001.

Musarò A. Le cellule staminali: dal mito di Prometeo alla medicina rigenerativa. In: Biotecnologie e progresso della medicina, University Press Mondadori Università, Sapienza Università di Roma, 2009.

Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. Nature 448, 313-317, 2007.

Pedersen RA. Embryonic stem cells for medicine. Sci Am 280, 68-73, 1999.

Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, De Luca M, Pellegrini G. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. N Engl J Med 363, 147-155, 2010.

Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term "stem cell". Cell Stem Cell 1, 35-38, 2007.

Rando TA, Chang HY. Aging, rejuvenation, and epigenetic reprogramming: resetting the aging clock. Cell 148, 46-57, 2012.

Robinton DA, Daley GQ. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. Nature 481, 295-305, 2012.

Rosenthal N. Youthful prospects for human stem-cell therapy. EMBO Rep 6, S30-S34, 2005.

Roy NS, Cleren C, Singh SK, Yang L, Beal MF, Goldman SA. Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. Nat Med 12, 1259-1268, 2006.

Schulenburg A, Ulrich-Pur H, Thurnher D, Erovic B, Florian S, Sperr WR, Kalhs P, Marian B, Wrba F, Zielinski CC, Valent P. Neoplastic stem cells: a novel therapeutic target in clinical oncology. Cancer 107, 2512-2520, 2006.

Scicchitano BM, Rizzuto E, Musarò A. Counteracting muscle wasting in aging and neuromuscular diseases: the critical role of IGF-1. Aging 1, 451-457, 2009.

Song H, Stevens CF, Gage FH. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. Nature 417, 39-44, 2002.

Tallacchini M. Fuga dalla bioetica. In: Boella L (a cura di), Bioetica dal vivo. Aut aut, 318, 107-118, 2003.

Tanaka EM. Regeneration: If they can do it, why can't we? Cell 113, 559-562, 2003.

Wang J, Rao S, Chu J, Shen X, Levasseur DN, Theunissen TW, Orkin SH. A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. Nature 444, 364-368, 2006.

Weissman IL. Medicine: politic stem cells. Nature 439, 145-147, 2006.

Wobus AM, Boheler KR. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. Physiol Rev 85, 635-678, 2005.

Wurmser AE, Gage FH. Stem cells: cell fusion causes confusion. Nature 416, 485-487, 2002.

Zhao XY, Li W, Lv Z, Liu L, Tong M, Hai T, Hao J, Guo CL, Ma QW, Wang L, Zeng F, Zhou Q. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. Nature 461, 86-90, 2009.

# PARTE SECONDA

5

# La meiosi

Massimo De Felici

La **meiosi**, dal greco "diminuzione", è un processo di divisione cellulare complesso che nei mammiferi riguarda esclusivamente le cellule germinali. Durante la meiosi, un'unica duplicazione del DNA è seguita da due divisioni cellulari che producono quattro cellule aploidi, ovvero cellule che contengono la metà dei cromosomi e del DNA della cellula madre da cui hanno avuto origine. Come vedremo più avanti in questo capitolo e nei capitoli seguenti, la meiosi nei mammiferi si verifica in una fase del processo di formazione dei gameti (gametogenesi) sia nel maschio che nella femmina. In questo capitolo analizzeremo più in generale questo complesso processo e lo ricollocheremo quindi all'interno della gametogenesi sottolineando le differenze che caratterizzano la meiosi nell'ovogenesi e nella spermatogenesi.

Come noto, le cellule del corpo umano possono essere suddivise in due categorie: **cellule somatiche** e **cellule germinali** o **gameti**. Queste ultime sono specializzate nella funzione riproduttiva della specie. Le cellule somatiche e le cellule germinali umane prima della meiosi possiedono 46 cromosomi nei quali è contenuta una quantità di DNA definita **2c** (condizione **diploide**). Il numero dei cromosomi diversi di una specie è indicato in generale con **n**; per la specie umana n = 23. Poiché in una cellula somatica durante lo svolgimento delle sue normali funzioni, e in una cellula germinale prima della meiosi, sono presenti due copie di ogni cromosoma (e quindi due copie o alleli di ogni gene), il numero dei cromosomi in queste cellule è, come indicato sopra, 2n = 46. Le cellule germinali al termine del loro processo di maturazione, ovvero gli spermatozoi nel maschio e gli ovociti nella donna, possiedono invece 23 cromosomi (n = 23) ed una quantità "c" di DNA, condizione definita **aploide**. Il dimezzamento del genoma nelle cellule germinali si realizza durante la meiosi ed è necessario in quanto alla fecondazione uno spermatozoo e un ovocito si uniscono mettendo in comune i loro 23 cromosomi. Dall'unione di uno spermatozoo con l'ovocito origina difatti l'uovo fecondato o zigote, che contiene 46 cromosomi (2n = 46), da cui deriveranno tutte le cellule del nuovo individuo (Fig. 5-1).

In generale possiamo quindi dire che durante la meiosi, il numero dei cromosomi tipico delle cellule di una specie si dimezza da 2n a n riducendo la quantità di DNA da 2c a c. Oltre che necessaria per dimezzare il genoma delle cellule germinali, la meiosi, come spiegheremo più avanti, permette il riassortimento dei geni materni e paterni grazie al **crossing over** e alla **combinazione casuale dei cromosomi** durante la prima divisione meiotica (meiosi I).

La meiosi comprende due divisioni cellulari (meiosi I e meiosi II) precedute da un'unica duplicazione del DNA. A seguito di tale duplicazione, che avviene nella fase S (sintesi) meiotica, e che precede la profase I, la

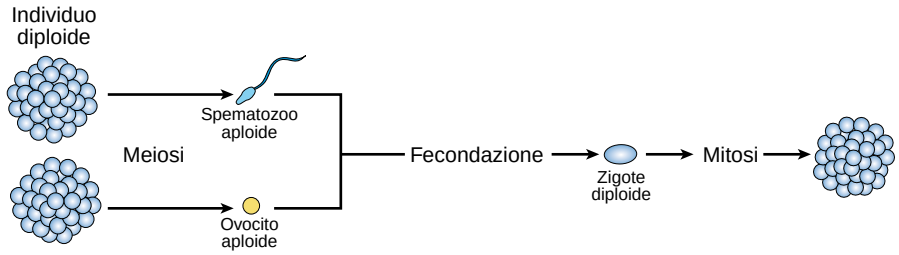



**Figura 5-1** Schema generale della meiosi nella riproduzione sessuale.

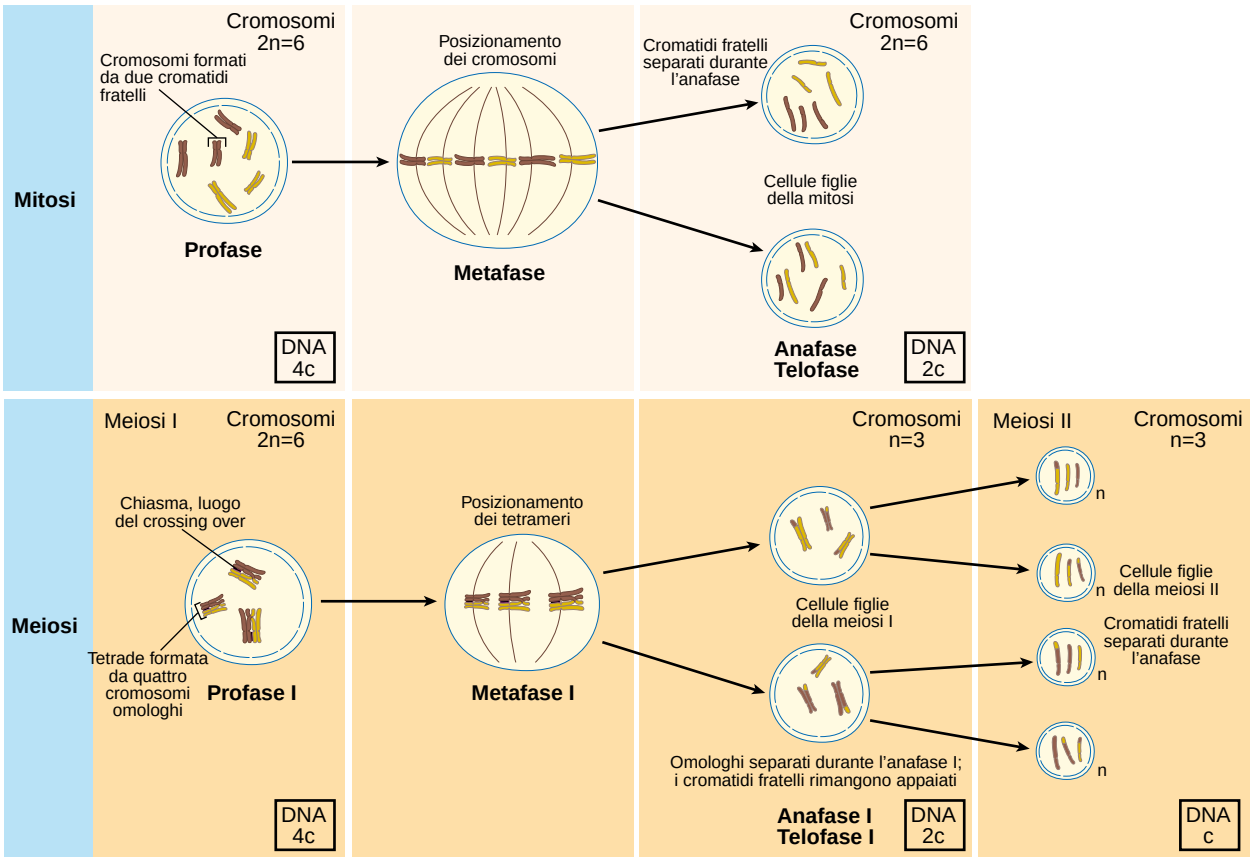



**Figura 5-2** ■ Schema che confronta gli aspetti generali della mitosi e della meiosi in una cellula con 6 cromosomi. Come noto le cellule del corpo umano possiedono invece 46 cromosomi.

quantità di DNA di una cellula germinale diventa 4c ed ogni cromosoma, costituito in precedenza da un singolo filamento di DNA (cromosoma monocromatidico), risulta formato da due cromatidi (cromosoma bicromatidico) (Fig. 5-2).

Come detto, la meiosi comprende due divisioni cellulari chiamate meiosi I e II, ognuna suddivisa in quattro fasi: profase I, metafase I, anafase I, telofase I e profase II (molto breve), metafase II, anafase II e telofase II. In generale, da una cellula germinale che entra in meiosi (nell'uomo 2n = 46 cromosomi bicromatidici e 4c DNA) alla fine della meiosi I si formano due cellule figlie (n = 23 cromosomi bicromatidici e 2c DNA) e da ciascuna di queste, alla fine della meiosi II, due cellule figlie (n = 23 cromosomi monocromatidici e "c" DNA). Il risultato finale è costituito da 4 cellule germinali aploidi che possiedono 23 cromosomi e "c" DNA (genoma aploide).

## LA PRIMA DIVISIONE MEIOTICA

La profase I è la fase più complessa e lunga della meiosi e viene suddivisa in quattro fasi (Fig. 5-3):

- **leptotene** – i cromosomi appaiono formati da 2 cromatidi in quanto il DNA si è già duplicato (DNA 4c);
- **zigotene** – ciascun cromosoma si appaia (**sinapsi**) al suo omologo. Una volta avvenuto il contatto fra i due omologhi in un determinato punto, prosegue l'appaiamento, come avviene nella chiusura di una cerniera lampo, per tutta la lunghezza dei cromatidi. Dal momento che ogni cromosoma in questa fase è costituito da due cromatidi identici, l'appaiamento degli omologhi coinvolge in realtà quattro cromatidi; perciò questo insieme di cromosomi omologhi è detto tetrade (dal greco "tetra" che significa "quattro");
- **pachitene** – i cromosomi si accorciano e si spiralizzano fortemente visualizzando i singoli cromatidi delle tetradi. In questo stadio si verifica il **crossing over** tra i quattro cromatidi dei cromosomi omologhi in corrispondenza di punti di appaiamento detti **chiasmi** (in media 2 o 3 per ogni tetrade). Si tratta di un importante processo di scambio di segmenti di DNA corrispondenti tra i cromatidi che altera l'assetto genetico dei cromosomi trasportando alleli dal genoma materno a quello paterno e viceversa. Per permettere il crossing over le molecole di DNA dei cromatidi hanno subito già prima della profase I numerosi tagli da parte di una speciale topoisomerasi chiamata **SPO11** (sporulation protein 11, vedi il paragrafo

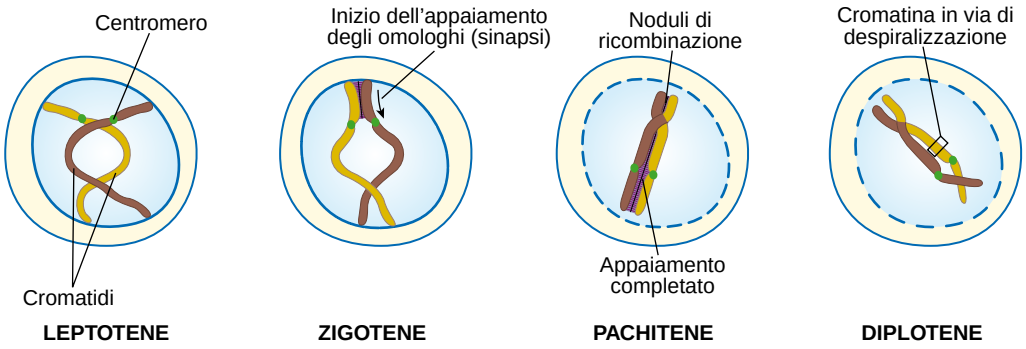



**FIGURA 5-3** ■ Le quattro fasi della profase I rappresentate per semplicità in una singola coppia di cromosomi omologhi.

"Processi e molecole") e alcuni segmenti di DNA vengono scambiati con le porzioni corrispondenti dei cromatidi. Completato questo processo, i due cromatidi di un cromosoma omologo non contengono più un materiale genetico identico: i cromosomi di origine materna ora contengono porzioni dei cromosomi omologhi e quindi alleli di geni di origine paterna e viceversa. Il crossing over è quindi un importante meccanismo di ricombinazione del materiale genetico proveniente dai due genitori. Come risultato, il/la figlio/a eredita una mescolanza casuale degli alleli dei due genitori per i diversi caratteri. In tutti gli organismi che si riproducono in modo sessuato, perciò, il crossing over è il principale responsabile della variabilità genetica degli individui che appartengono alla stessa specie. Le sinapsi e il crossing over sono fenomeni complessi, che coinvolgono numerose proteine strutturali ed enzimi. Alcune di queste proteine formano il **complesso sinaptinemale**, una struttura proteica che si assembla durante lo zigotene e svolge un ruolo chiave nella sinapsi e nel crossing over tra gli omologhi;

- **diplotene** – i cromosomi omologhi cominciano a separarsi rimanendo tuttavia uniti in corrispondenza dei punti chiamati **chiasmi**, dove è avvenuto il crossing over.

Terminata la profase I, la cellula meiotica passa attraverso la **metafase I**, l'**anafase I** e la **telofase I**. Al termine di queste fasi si formano due cellule che possiedono metà del numero dei cromosomi iniziale (per cui la prima divisone meiotica è definita riduzionale), ma che, essendo ogni cromosoma formato ancora da due cromatidi, possiedono una quantità 2c di DNA. Durante queste fasi i due omologhi che si erano appaiati si separano, mentre i due cromatidi fratelli di ciascun cromosoma rimangono uniti nella regione del centromero, sul cui cinetocore (rivestimento proteico esterno) si attaccano microtubuli del fuso diretti verso un unico centrosoma. Questi ultimi aspetti distinguono la prima divisione meiotica dalla divisione mitotica e dalla seconda divisione meiotica, che avvengono con la separazione dei cromatidi fratelli a livello del centromero. L'adesione tra i cromatidi fratelli e tra i cromosomi omologhi è mediata da un complesso di proteine chiamate **coesine** che si localizzano nella regione dei chiasmi e tra i cromatidi fratelli. All'anafase meiotica I solo le coesine tra i cromosomi omologhi vengono rimosse da un complesso enzimatico chiamato **separasi** mentre le coesine tra i centromeri dei cromatidi fratelli rimangono intatte (Fig. 5-4). Al termine della prima divisione meiotica, gli omologhi di origine materna e paterna si ridistribuiscono nelle due cellule figlie in modo casuale. Questa combinazione casuale degli omologhi rappresenta un secondo meccanismo di mescolamento dei genomi materno e paterno alla base della variabilità genetica (vedi più avanti).

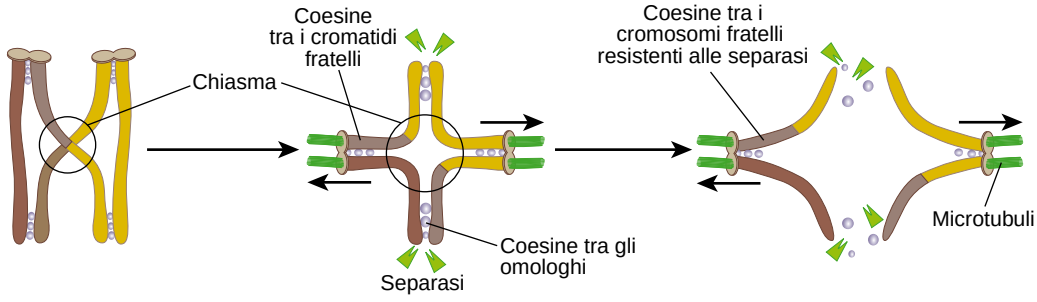



**FIGURA 5-4** ■ Disegno di una coppia di cromosomi omologhi con un solo chiasma in profase I, metafase I e anafase I. Notare le coesine e l'azione delle separasi sulle coesine che tengono uniti i cromosomi omologhi nella regione del chiasma.

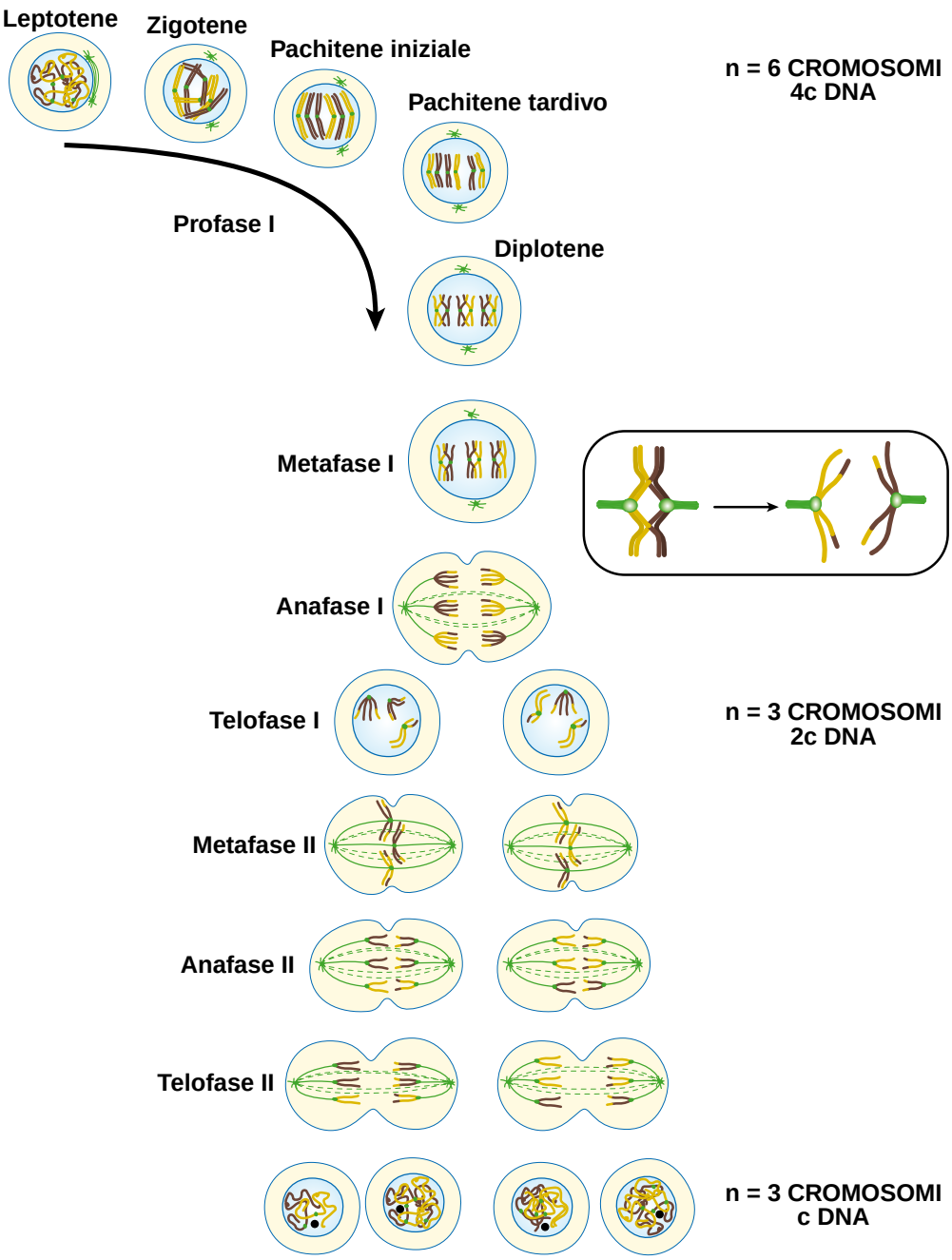



**Figura 5-5** ■ Schema generale della meiosi in una cellula con tre coppie di omologhi (sei cromosomi). A destra un particolare di una coppia di cromosomi omologhi tra la metafase I e l'anafase I; notare che ciascun omologo contiene un cromatide con segmenti che provengono da un cromatide dell'altro omologo come risultato del crossing over. Al termine della telofase II ciascuna delle quattro cellule possiede tre cromosomi e c DNA.

## LA SECONDA DIVISIONE MEIOTICA

Ciascuna delle due cellule che risultano dalla I divisione meiotica si divide senza duplicare il DNA. All'inizio di tale divisione ogni cellula è già aploide in quanto possiede la metà del numero dei cromosomi iniziali, ma ogni cromosoma è formato da due cromatidi, quindi possiede ancora 2c DNA. La seconda divisione avviene in tre fasi in quanto la profase II è pressoché assente: la **metafase II**, l'**anafase II** e la **telofase II**. Il risultato finale è la produzione di quattro cellule aploidi. Da notare che questa seconda divisione avviene con le stesse modalità di una divisione mitotica, in cui le separasi rimuovono il complesso delle coesine che tiene insieme i cromatidi fratelli di un cromosoma a livello del centromero (Fig. 5-5).

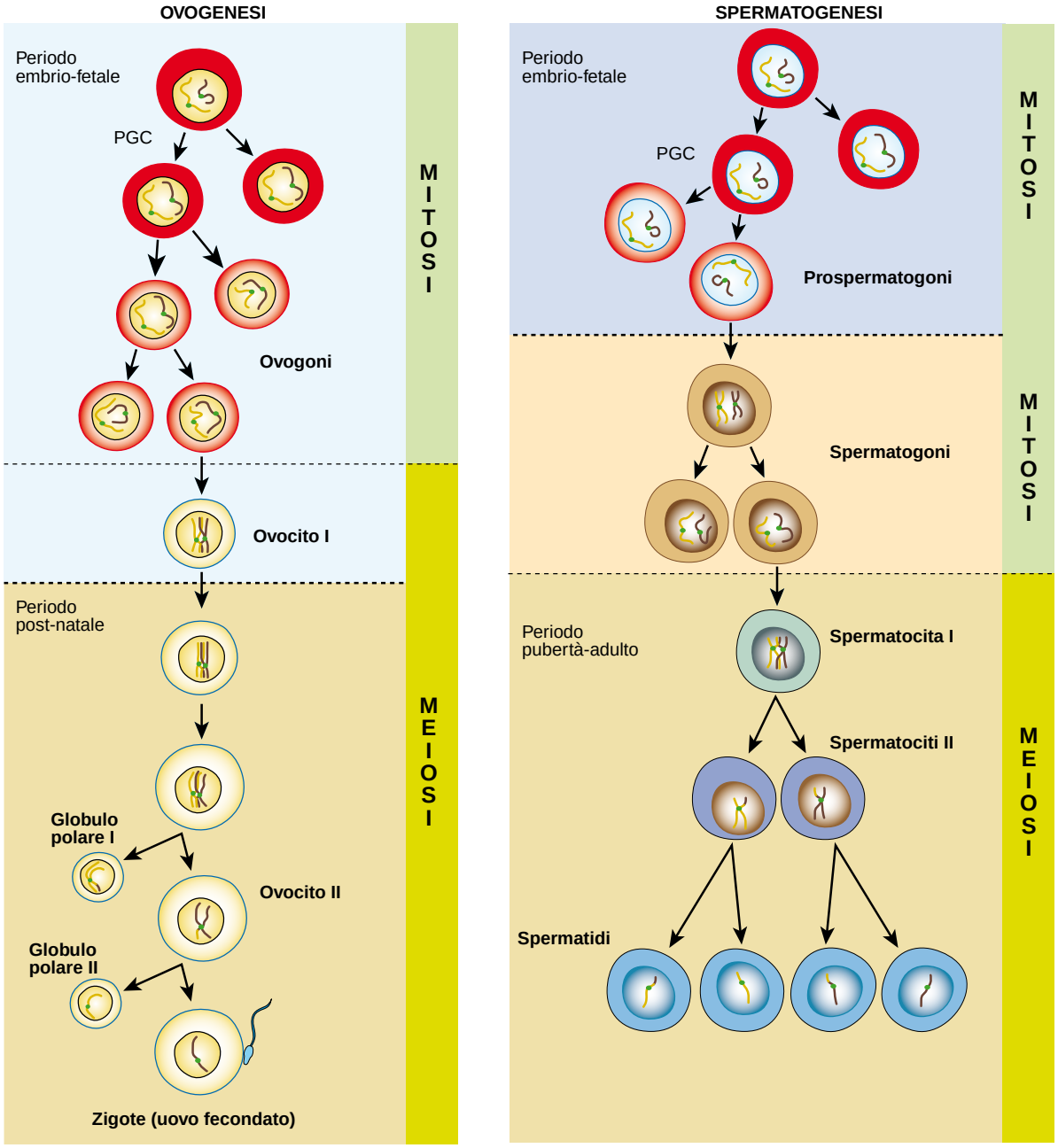



**FIGURA 5-6** ■ Confronto tra la meiosi nell'ovogenesi e la spermatogenesi. Notare le differenze temporali nelle mitosi e nella meiosi e il risultato finale: la meiosi nell'ovogenesi si conclude solo dopo la fecondazione con la formazione di un uovo fecondato o zigote; nella spermatogenesi si conclude con la formazione di quattro spermatidi. Per semplicità è rappresentata solamente una coppia di omologhi per cellula e il processo mitotico e meiotico in una singola cellula germinale. Notare che nell'ovogenesi al termine della meiosi si forma una sola cellula funzionale (lo zigote) e due cellule destinate a degenerare (globulo polare I e II); nella spermatogenesi si formano quattro cellule funzionali (spermatidi) destinate ciascuna a differenziare senza ulteriori divisioni in spermatozoi.

## PROCESSI E MOLECOLE

### *La meiosi nell'ovogenesi e nella spermatogenesi*

Sebbene le fasi e le funzioni della meiosi siano le stesse nell'ovogenesi e nella spermatogenesi, esistono importanti differenze tra la meiosi che si verifica in questi due processi (Fig. 5-6).

La meiosi nell'ovogenesi umana inizia intorno al 4° mese nelle ovaie fetali (ovogoni diventano ovociti primari). Negli ovociti primari la meiosi si arresta alla fine della profase I, allo stadio di diplotene, prima della nascita.

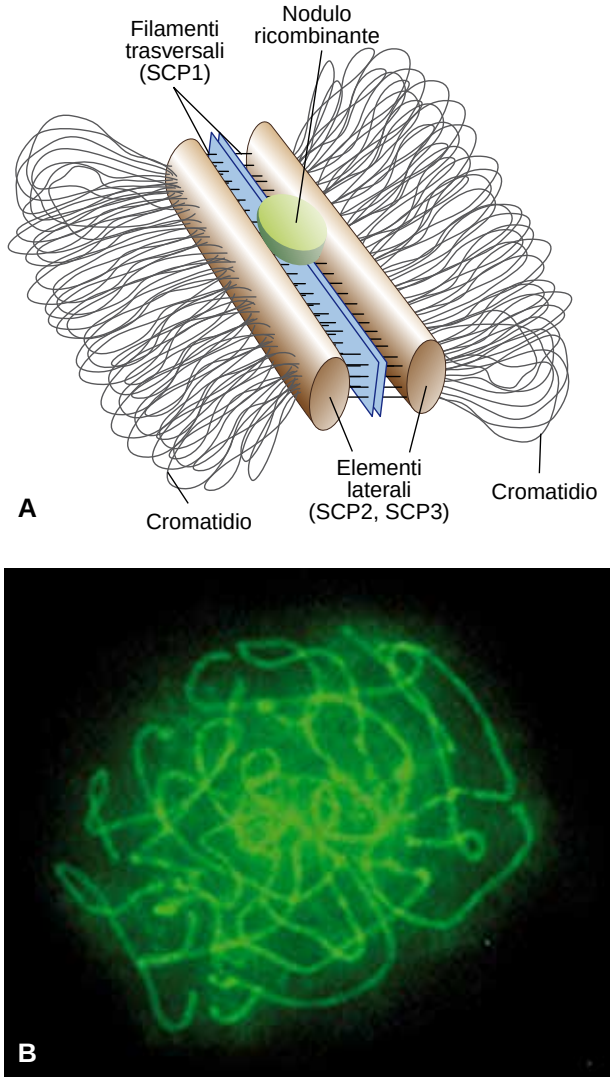



**Figura 5-7** ■ *A)* Disegno schematico del complesso sinaptinemale tra due cromosomi omologhi. *B)* Cromosomi meiotici del topo allo stadio di pachitene visualizzati mediante un anticorpo fluorescente contro la proteina del complesso sinaptinemale SCP3 (per gentile concessione della Dr.ssa F.G. Klinger.)

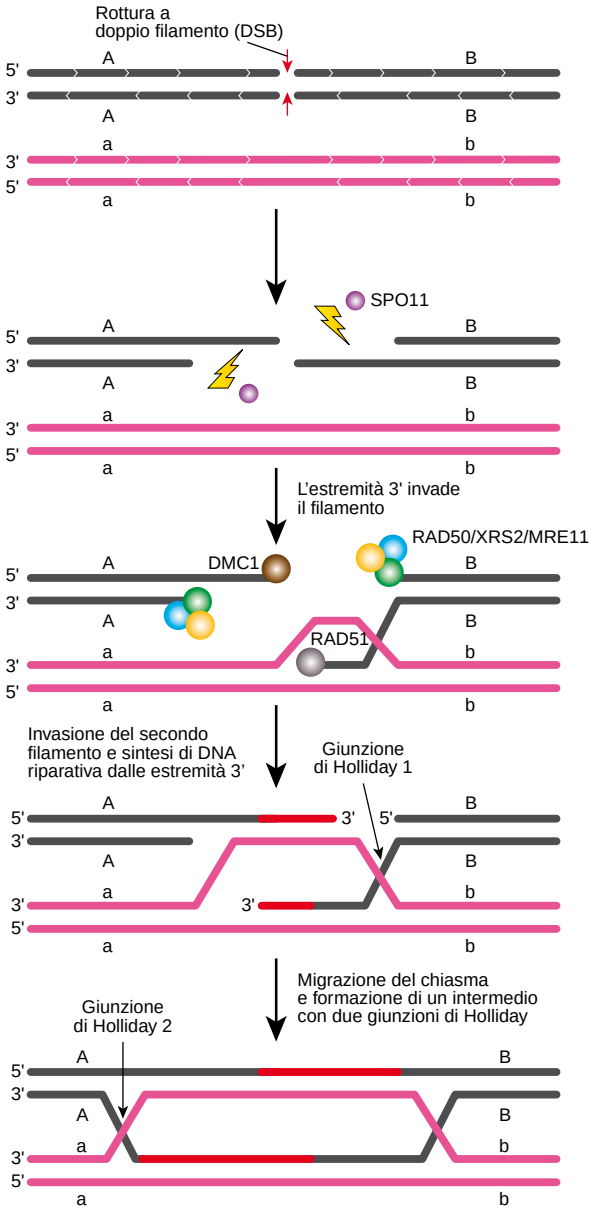



**Figura 5-8A** ■ *A)* La ricombinazione inizia con tagli ai due filamenti di una molecola di DNA (DSB) di un cromatide per opera di un enzima chiamato SPO11. L'estremità in 5' di ciascun filamento vengono ritagliate ed accorciate da un complesso enzimatico RAD50-XRS2-MRE11, mentre l'estremità in 3' rimangono intatte e libere di legare DMC1 e RAD51; queste estremità cercano sequenze nucleotidiche omologhe sul cromatide vicino. Quando queste vengono trovate, DMC1 inizia il processo di ricombinazione omologa invadendo con una delle estremità 3' il doppio filamento di DNA del cromatide vicino (prima giunzione di Holliday). Segue quindi sintesi di DNA, che allunga questa estremità, e che viene catturata dall'altra estremità in 5' generando una seconda giunzione di Holliday. Le giunzioni di Holliday possono essere risolte *(B)* da un enzima che taglia solamente i due filamenti incrociati a livello delle giunzioni in modo simmetrico (in 1) o tagliando in aggiunta gli altri due filamenti complementari in modo asimmetrico (in 2). Nel primo caso si avrà un crossing over incompleto, o non crossing over, nel secondo caso si avrà crossing over.

*(La figura continua a pagina seguente)*

A partire dalla pubertà, durante un normale ciclo ovarico di 28 giorni, un solo ovocito termina il processo maturativo all'interno di un follicolo di Graaf (vedi Capitolo 7). In questo ovocito primario, poche ore prima dell'ovulazione la meiosi riprende e prosegue con la metafase I, l'anafase I e la telofase I. Al termine della telofase I l'ovocito primario va incontro ad una citodieresi diseguale che produce un ovocito secondario e una piccola cellula chiamata globulo polare I. Alla metafase II si verifica un secondo arresto della meiosi e l'ovocito secondario viene ovulato. La meiosi riprenderà solo se l'ovocito verrà fecondato. In tal caso, poche ore dopo la fecondazione, l'uovo fecondato o zigote emette un secondo globulo polare (globulo polare II) completando la meiosi. È evidente quindi che la meiosi nell'ovogenesi produce una sola

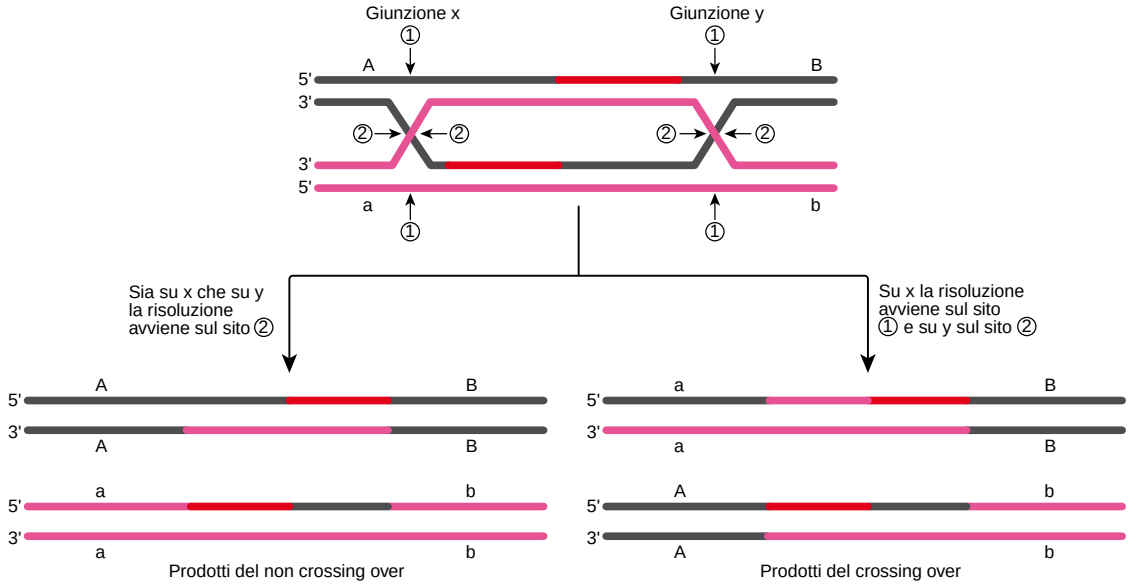



**Figura 5-8B** *(Continuazione)*

cellula funzionale, l'ovocito secondario, e non quattro come è la regola generale della meiosi. Inoltre l'ovocito secondario completa la meiosi e diviene aploide nel suo contenuto di DNA solamente dopo la fecondazione. Il globulo polare I e II sono piccole cellule destinate a degenerare. Molto raramente il globulo polare I si divide, portando a tre il numero finale dei globuli polari.

La meiosi nella spermatogenesi inizia nei testicoli dopo la nascita nel periodo della pubertà. Uno spermatogonio A dopo una serie di mitosi si divide, sempre mitoticamente, producendo due spermatogoni B. Questi dopo alcune divisioni mitotiche entrano in meiosi divenendo spermatociti I. Al termine della meiosi I, ogni spermatocita I si divide e dà origine a due spermatociti II. Ogni spermatocita II dà origine a due spermatidi. La durata della meiosi nella spermatogenesi umana è di circa 24 giorni.

## Il complesso sinaptinemale

Il **complesso sinaptinemale** è una struttura proteica che si forma tra due cromosomi omologhi all'inizio della profase meiotica I e scompare alla fine di questa fase. Il complesso è formato da due regioni laterali formate principalmente da due proteine chiamate **SCP3** (synaptonemal complex protein 3) e **SCP2** ed una regione centrale che consiste di filamenti trasversali di una proteina chiamata **SCP1** (Fig. 5-7). Nella regione centrale del complesso si trovano le proteine **SYCE** (synaptonemal complex element) 1, 2 e 3. Nel maschio i cromosomi X e Y si appaino solo parzialmente e possiedono un complesso sinaptinemale molto corto. Nella regione centrale si trovano generalmente uno o più **noduli di ricombinazione**. Si pensa che il complesso sia necessario a mediare l'appaiamento dei cromosomi omologhi (sinapsi) e la ricombinazione omologa. Recenti risultati hanno tuttavia indicato che il complesso non è indispensabile per la sinapsi tra gli omologhi, in sua assenza questa funzione viene svolta dalle coesine. L'opinione corrente è che esso formi la base strutturale che consente agli omologhi di completare il crossing over. In questo contesto i noduli di ricombinazione corrisponderebbero ai punti in cui si stanno risolvendo gli scambi.

## Il meccanismo molecolare del crossing over

Il meccanismo molecolare del crossing over nelle cellule germinali degli eucarioti è basato su un processo di **ricombinazione omologa del DNA** simile a quello utilizzato da altre cellule per riparare danni o alterazioni delle molecole di DNA che si verificano in diverse situazioni, inclusa la duplicazione del DNA durante il ciclo cellulare.

Secondo il modello proposto da Meselson e Redding questo processo inizia con tagli sul doppio filamento di una molecola di DNA (chiamati double strand breaks, DSB) e prosegue con un processo che porta alla ricombinazione omologa di tratti del DNA. Nella meiosi poco prima dello stadio di leptotene numerosi DSB vengono operati dalla topoisomerasi SPO11 nel DNA di ognuno dei due cromatidi dei cromosomi omologhi di ogni coppia. Nell'uomo è stato stimato che SPO11 esegue circa 200 tagli del DNA in ogni nucleo ovvero circa 4 tagli per ogni coppia di omologhi. I DSB causano l'attivazione di diversi complessi enzimatici che riparano le rotture del DNA mediante un processo che si conclude con lo scambio di porzioni di materiale genetico tra i cromatidi dei cromosomi omologhi. Gli scambi possono avvenire in modo apparentemente casuale tra tutti e quattro i cromatidi, ma il crossing over, con scambio di segmenti di DNA che porta effettivamente alla traslocazione di alleli diversi da un genoma (materno e paterno) all'altro, si

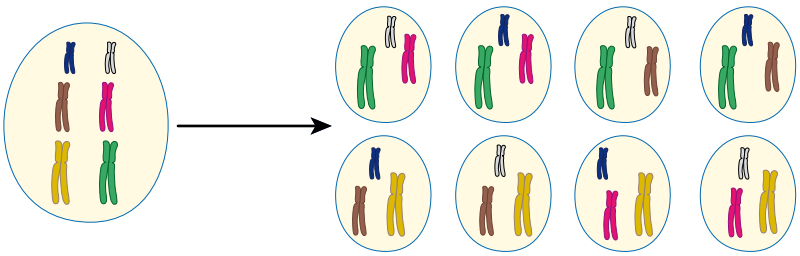
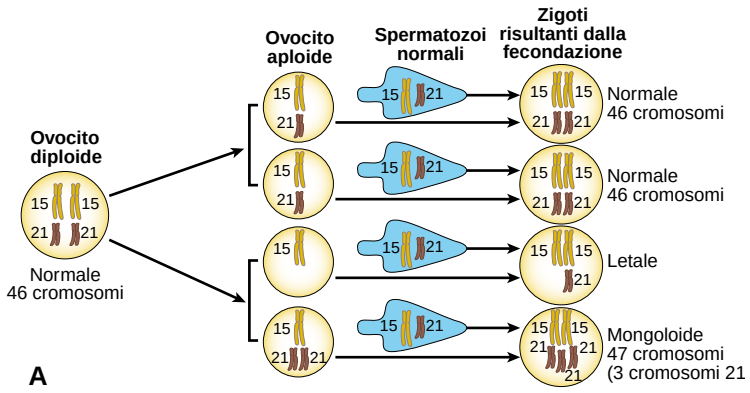


**Figura 5-9** ■ Combinazioni possibili al termine della I divisione meiotica in una cellula con solo 3 coppie di cromosomi omologhi $2^3 = 8$.



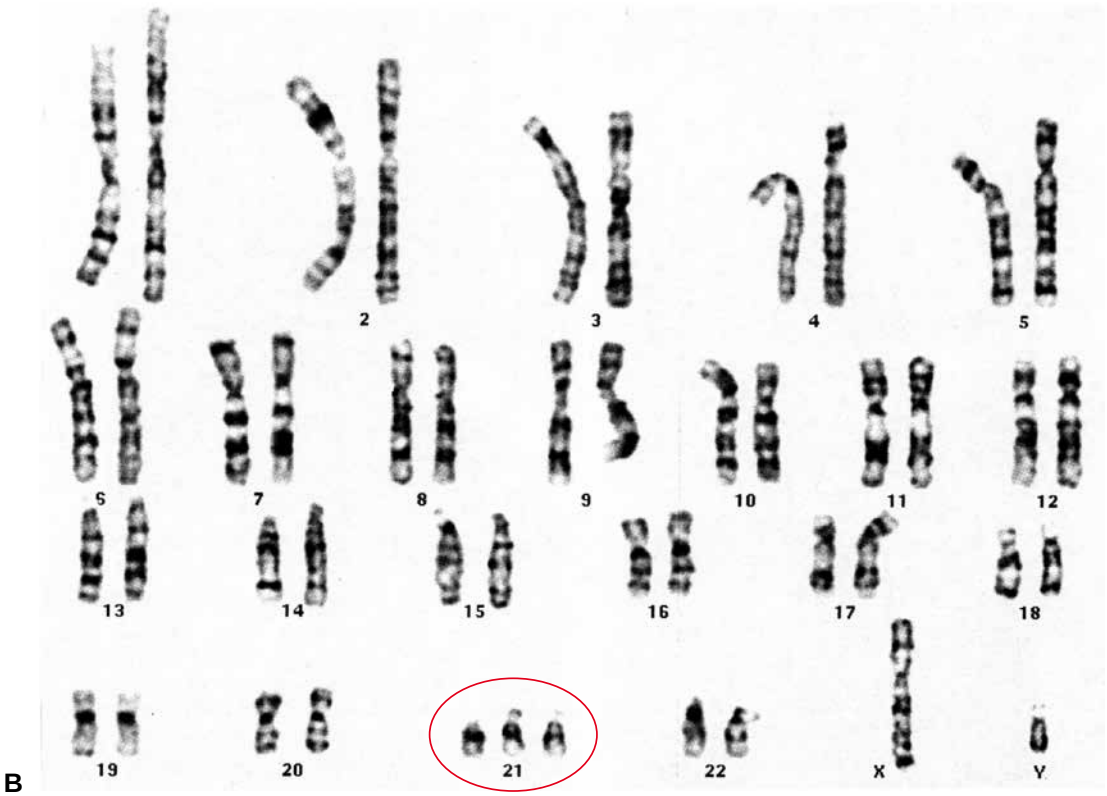




**Figura 5-10** ■ Meccanismi che generano aneuploidie. *A)* Mancata disgiunzione del cromosoma 21 nella sindrome di Down. *B)* Cariotipo di un maschio con sindrome di Down: notare tre cromosomi 21 (cerchio). (L'immagine *B* è tratta da P. Boccato, a cura di, Citopatologia diagnostica. In: Trattato di medicina di laboratorio, vol. VIII/2, Piccin Nuova Libraria, Padova, 2006.)

verifica solamente quando questo processo riguarda i cromatidi non fratelli (Fig. 5-8).

Sono stati individuati molti enzimi con funzione di riparazione del DNA che intervengono nel crossing over. Tra questi le ricombinasi RAD51 (recombination protein AD51) necessaria per la ricombinazione sia meiotica che mitotica e DMC1 (dosage suppressor of mck1) specifica per quella meiotica. L'evento cruciale del processo di ricombinazione omologa, che si verifica dopo i tagli sul DNA è la connessione che si stabilisce fra due filamenti della doppia elica di DNA dei cromatidi di cromosomi omologhi. Una delle estremità in 3' tagliate di uno dei due filamenti lascia il suo partner e si appaia con il complementare dell'altro che non ha subito tagli e che viene spostato formando un'ansa. Questo processo crea un primo incrocio (chiasma) tra questi due filamenti chiamato **giunzione di Holliday** (Fig. 5-8). Anche l'altra estremità tagliata in 5' del filamento che ha già formato una giunzione di Holliday, si incrocia con il complementare con non ha subito tagli e si unisce con il segmento di DNA neosintetizzato sul filamento che si è appaiato con il complementare non tagliato; si forma così una seconda giunzione di Holliday. Le estremità tagliate del secondo filamento, che non si è incrociato, si riuniscono con neosintesi di DNA. Se le giunzioni di Holliday vengono risolte per un semplice scorrimento dei filamenti incrociati, non si avrà crossing over, ma solamente riparazione dei tagli. Qualora le giunzioni vengano risolte da un'endonucleasi scoperta nei batteri chiamata RUV-C (resistent to UV light-C), che negli eucarioti corrisponde probabilmente a GEN-1 (gene homologous-1), sono possibili combinazioni diverse. Per esempio quando il taglio avviene sui due filamenti incrociati a livello delle giunzioni in modo simmetrico si avrà un non crossing over o crossing over incompleto, se invece in aggiunta vengono tagliati gli altri due filamenti complementari in modo asimmetrico (più frequente) si avrà crossing over (Fig. 5-8).

### *Assortimento casuale dei cromosomi materni e paterni al termine della meiosi I*

Le combinazioni possibili al termine della meiosi I sono $2^n$, dove n = numero di cromosomi per corredo aploide, ovvero numero di coppie di omologhi, di una specie. Nella specie umana il numero di cellule germinali con assortimento di cromosomi diversi che si possono formare a seguito delle combinazioni possibili dei 46 cromosomi sono $22^3 = 8{,}4 \times 10^6$ (Fig. 5-9).

## ASPETTI CLINICI

### *Aneuploidie cromosomiche*

I difetti nella separazione degli omologhi al termine della meiosi I sono la causa primaria di aneuploidie cromosomiche (difetti di numero) degli autosomi e dei cromosomi sessuali. L'assenza o la presenza di un autosoma sopranumerario sono di norma incompatibili con lo sviluppo di un individuo vitale, ad eccezione dei cromosomi di piccole dimensioni, come per esempio i cromosomi 21, 18 e 13 o di pezzi di un cromosoma. Aneuploidie dei cromosomi sessuali sono invece per la maggior parte compatibili con la vita anche se di norma comportano gravi anomalie. Poiché la meiosi che si verifica nel corso dell'ovogenesi è caratterizzata da una profase I che dura diversi anni (vedi avanti), difetti nella separazione degli omologhi si verificano frequentemente nell'ovogenesi e aumentano notevolmente in funzione dell'età della donna.

Una nota aneuploidia (trisomia) autosomica riguarda il cromosoma 21 e causa il 95% dei casi della **sindrome di Down** (mongolismo) (Fig. 5-10). Due note aneuploidie dei cromosomi sessuali sono la **sindrome di Turner** (donne, X0) e la **sindrome di Klinefelter** (uomini, XXY) (Figg. 5-11 e 5-12).

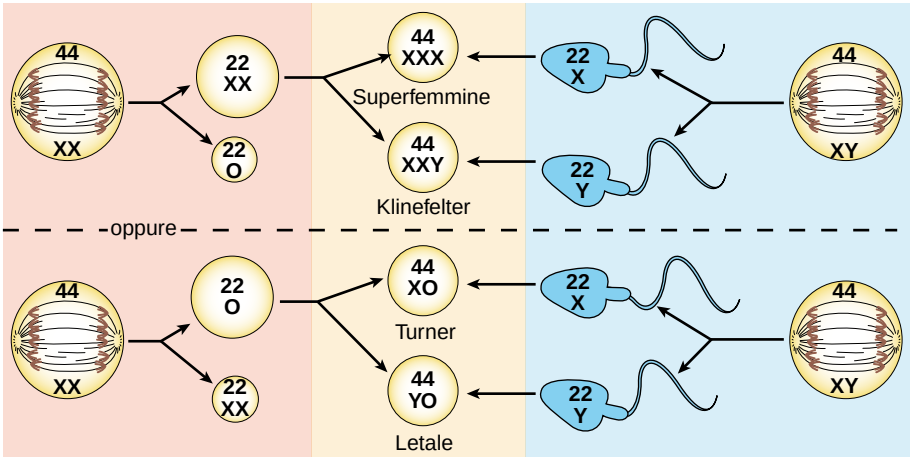



**Figura 5-11** ■ La mancata disgiunzione del cromosoma X alla I divisione meiotica durante l'ovogenesi causa la sindrome di Klinefelter e di Turner.

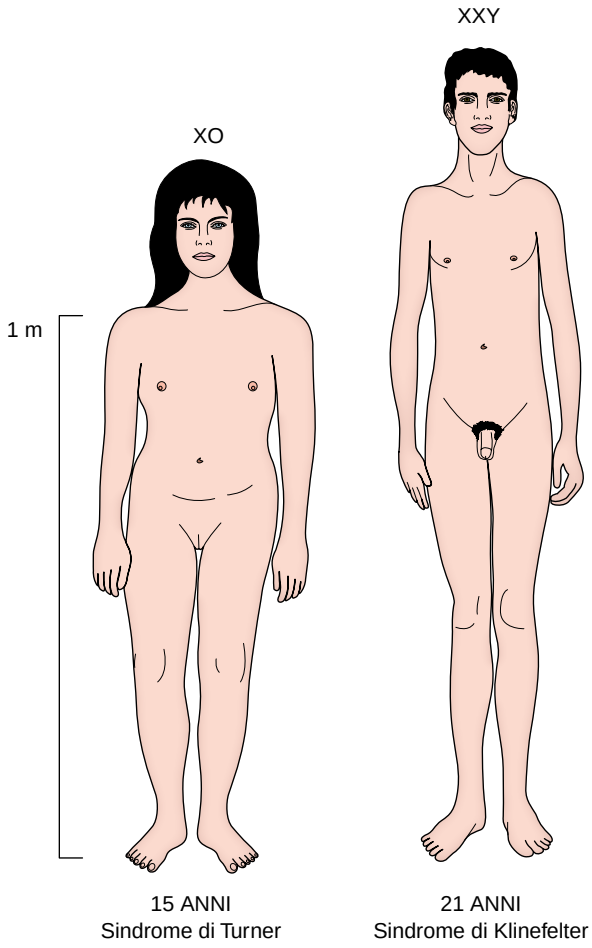



**Figura 5-12** ■ Riproduzione del fenotipo di individui con sindrome di Turner e di Klinefelter.

## Letture consigliate

Keeney S, Giroux CN, Kleckner N. Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. Cell 88(3), 375-384, 1997.

Lamb NE, Freeman SB, Savage-Austin A, Pettay D, Taft L, Hersey J, Gu Y, Shen J, Saker D, May KM, Avramopoulos D, Petersen MB, Hallberg A, Mikkelsen M, Hassold TJ, Sherman SL. Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II. Nature Genetics 14, 400-405, 1996.

Mehlmann LM. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. Reproduction 130, 791-799, 2005.

Morelli MA, Cohen PE. Not all germ cells are created equal: aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. Reproduction 130, 761-781, 2005.

Page SL, R. Hawley S. The genetic and molecular composition of the synaptonemal complec. Annual Review of Cell and Developmental Biology 20, 525-558, 2004.

Petronczki M, Siomos MF, Nasmyth K. The molecular biology of chromosome segregation in meiosis. Cell 112, 423-440, 2003.

Revenkova E, Eijpe M, Heyting C, Hodges CA, Hunt PA, Liebe B, Scherthan H, Jessberger R. Cohesin SMC1 beta is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. Nature Cell Biology 6, 555-562, 2004.

Revenkova E, Jessberger R. Keeping sister chromatids together: cohesins in meiosis. Reproduction 130, 783-790, 2005.

Sybenga J. What makes homologous chromosomes find each other in meiosis? A review and an hypothesis. Chromosoma 108, 209-219, 1999.

Szostak JW, Orr-Weaver FW, Rothstein RJ, Stahl FW. The double-strand-break repair model for recombination. Cell 33(1), 25-35, 1983.

Uhlmann F. Chromosome cohesion and segregation in mitosis and meiosis. Current Opinion in Cell Biology 13, 754-761, 2001.

Watanabe Y. Sister chromatid cohesion along arms and at centromeres. Trends in Genetics 21, 405-412, 2005.

6

# Spermatogenesi e apparato genitale maschile

Carla Boitani e Antonio Filippini

L'apparato genitale maschile è responsabile della produzione dei gameti maschili aploidi, gli **spermatozoi**, e della loro trasmissione, in una sospensione di liquido seminale, all'interno delle vie genitali femminili. Il sistema riproduttivo maschile è composto dagli organi sessuali primari, i **testicoli** (organi pari contenuti nello scroto), e da un sistema di dotti o **vie genitali** (note anche come vie spermatiche) che comprendono i condottini efferenti, l'epididimo, il dotto deferente, il dotto eiaculatore e gran parte dell'uretra (Fig. 6-1). Del sistema riproduttivo maschile fanno anche parte una serie di **ghiandole esocrine annesse alle vie genitali** responsabili della produzione del liquido seminale (le vescichette seminali, la prostata e le ghiandole bulbo-uretrali di Cowper) e l'organo copulatore, il pene.

Il testicolo, oltre a formare gli spermatozoi nel processo della spermatogenesi, è anche una ghiandola endocrina dove avviene la produzione e la secrezione di **ormoni sessuali maschili** (**androgeni**). La produzione degli spermatozoi inizia alla pubertà (maturità sessuale), mentre la produzione di ormoni è fondamentale già durante lo sviluppo embrionale ed è richiesta nel corso di tutta la vita. Gli ormoni androgeni (**testosterone** ed il suo derivato dieci volte più potente, il **diidrotestosterone**, DHT) sono infatti responsabili della formazione, dello sviluppo e della funzione dei tubuli seminiferi e degli organi sessuali accessori interni nonché dei genitali esterni. Inoltre questi ormoni determinano i caratteri sessuali secondari del maschio (tono di voce, muscolatura, aggressività, sviluppo dei peli, crescita del pene e dei testicoli).

La **spermatogenesi** e la produzione di androgeni sono confinate in regioni distinte del testicolo e quindi il testicolo è istologicamente e funzionalmente compartimentalizzato: il processo della spermatogenesi si realizza nei **tubuli seminiferi** mentre gli ormoni androgeni sono sintetizzati dalle **cellule del Leydig**, collocate nel compartimento interstiziale intercalato tra i tubuli.

## CENNI DI ANATOMIA DEL TESTICOLO E DELLE VIE GENITALI

La gonade maschile, sede del differenziamento degli spermatozoi, è un organo ghiandolare di forma ovoidale completamente avvolto da un robusto rivestimento di tessuto connettivo fibroso, la **tonaca albuginea**. Quest'ultima si ispessisce posteriormente formando il mediastino del testicolo che è anche il punto di convergenza dei vasi sanguigni che irrorano la gonade. Dal mediastino si propagano verso l'interno dell'organo sottili sepimenti connettivali che suddividono l'organo in circa 250 regioni, di forma vagamente piramidale, denominati **lobuli** o **logge del testicolo**. Ogni lobulo contiene da uno a quattro tubuli a fondo cieco molto convoluti noti come **tubuli seminiferi** (Fig. 6-1). Quando disteso, un tubulo seminifero può raggiungere una lunghezza di oltre 100 cm e un diametro mediamente di 200 µm. I tubuli seminiferi sono immersi in uno stroma connettivale intralobulare che è continuo con il connettivo del mediastino e dei setti. Gli spazi intertubulari fra le anse dei tubuli seminiferi (interstizio) sono occupati da un **connettivo lasso interstiziale** contenente vasi sanguigni e linfatici e le **cellule interstiziali endocrine del Leydig** (che secernono testosterone) nonché macrofagi, fibroblasti, linfociti e mastociti (Figg. 6-2 e 6-3). La lunghezza stimata complessiva dei tubuli seminiferi nei due testicoli è di circa 700 m. Ogni tubulo seminifero forma un'ansa molto contorta, con entrambe le estremità che comunicano, attraverso i tubuli retti, con la ***rete testis***, una rete di canalicoli intercomunicanti che si anastomizzano tra loro localizzata nel mediastino del testicolo. La *rete testis* è poi in continuità con 10-12 **condottini efferenti** che costituiscono il tratto iniziale delle vie spermatiche esterne alla gonade, o vie genitali, e veicolano gli spermatozoi dalla *rete testis* verso il canale dell'epididimo. L'**epididimo** è un organo pari e rappresenta il tratto delle vie genitali interposto tra la *rete testis* e il dotto deferente. Il canale dell'epididimo è un sottile singolo dotto, lun-

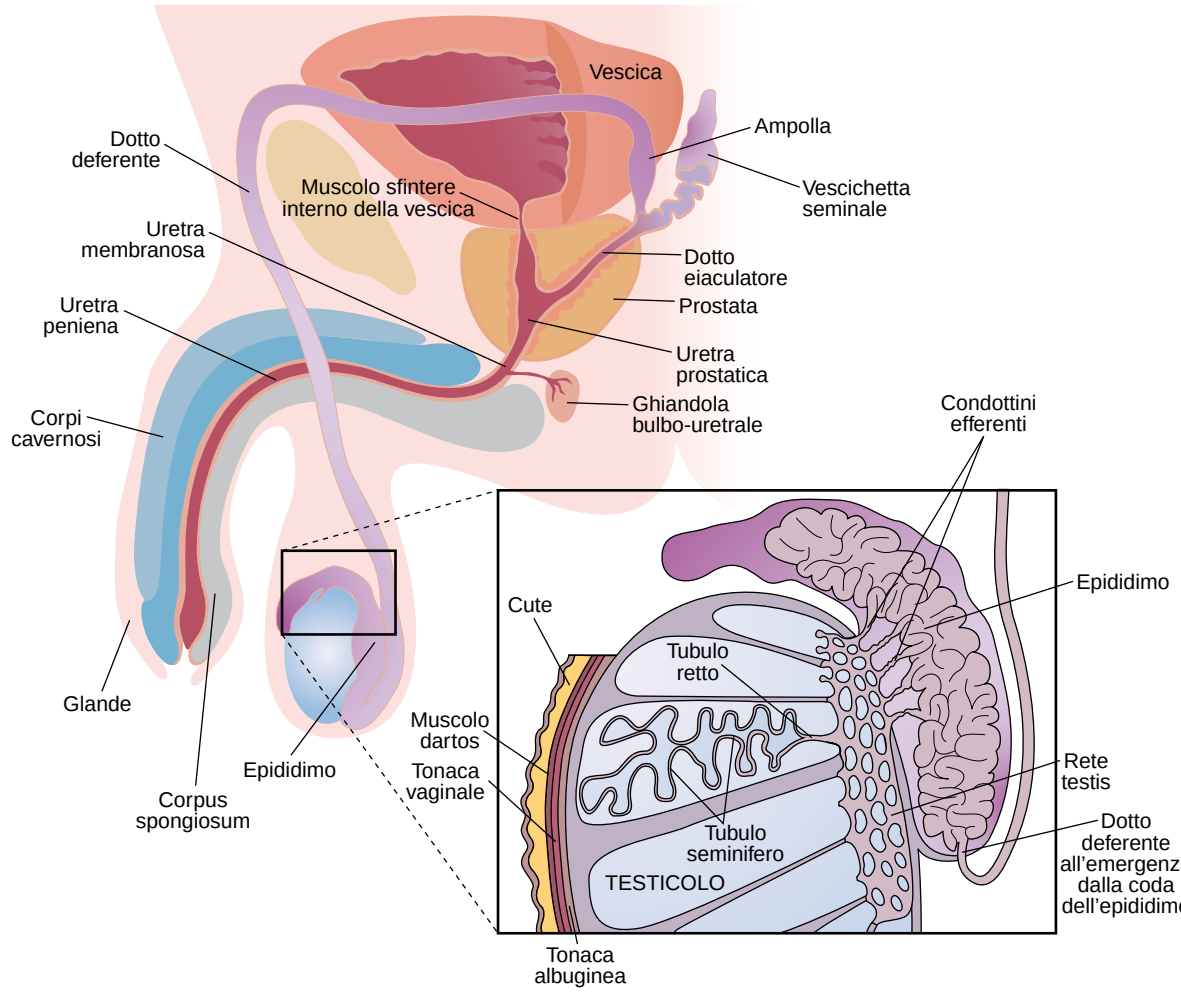



**Figura 6-1** ■ Schema generale dell'apparato genitale maschile e disegno schematico della struttura del testicolo (nell'inserto).

go circa 6 metri, che con andamento tortuoso si avvolge su se stesso e forma una struttura lunga circa 5 cm applicata sul margine posteriore del testicolo (Figg. 6-1, 6-3B). Nell'epididimo si distinguono tre parti: la **testa**, che costituisce la parte più voluminosa situata al polo superiore e in rapporto con i condottini efferenti; il **corpo**, che costituisce la parte intermedia; la **coda**, che si trova all'estremità inferiore e a questo livello l'epididimo si ripiega verso l'alto e si continua con il proprio dotto deferente. Ciascun **dotto deferente** è un canale che si estende dal canale dell'epididimo al dotto eiaculatore, è lungo circa 30 cm ed ha un diametro di 2,5 mm; la sua parte terminale si presenta dilatata e prende il nome di **ampolla**. Il **dotto eiaculatore**, lungo circa 1-2 cm, costituisce l'ultimo tratto delle vie genitali ed origina dalla confluenza del dotto deferente con il breve dotto in uscita dalla vescichetta seminale e termina aprendosi, insieme al dotto controlaterale, nell'uretra prostatica dopo aver attraversato la prostata. Gli spermatozoi prodotti nei tubuli seminiferi attraversano gli epididimi dove si accumulano e vanno incontro a un importante processo di maturazione funzionale che li rende mobili (il tempo medio di transito nell'epididimo è al massimo una settimana). Gli spermatozoi passano quindi nei dotti deferenti, nei dotti eiaculatori, nell'uretra e vengono infine espulsi all'esterno. La progressione degli spermatozoi lungo le vie genitali maschili è dovuta, in particolare, alla contrazione di tipo peristaltico della parete muscolare dei dotti delle vie spermatiche e l'eiaculazione retrograda è prevenuta dalla contrazione dello sfintere interno della vescica. Durante questo percorso, agli spermatozoi si aggiungono i prodotti di secrezione degli stessi dotti e delle ghiandole esocrine accessorie annesse ai dotti (**vescichette seminali**, **prostata**, **ghiandole bulbo-uretrali**), costituendo nell'insieme il liquido seminale. Il volume medio, comunque, dipendente dall'età, dell'eiaculato nell'uomo è poco più di 3 ml e contiene 200-300 milioni di spermatozoi.

Il rifornimento di sangue al testicolo deriva principalmente dall'**arteria testicolare** (arteria spermatica interna) che ha origine a livello della seconda vertebra lombare direttamente dall'aorta addominale. Questi vasi arteriosi, dopo un lungo percorso retroperitoneale,

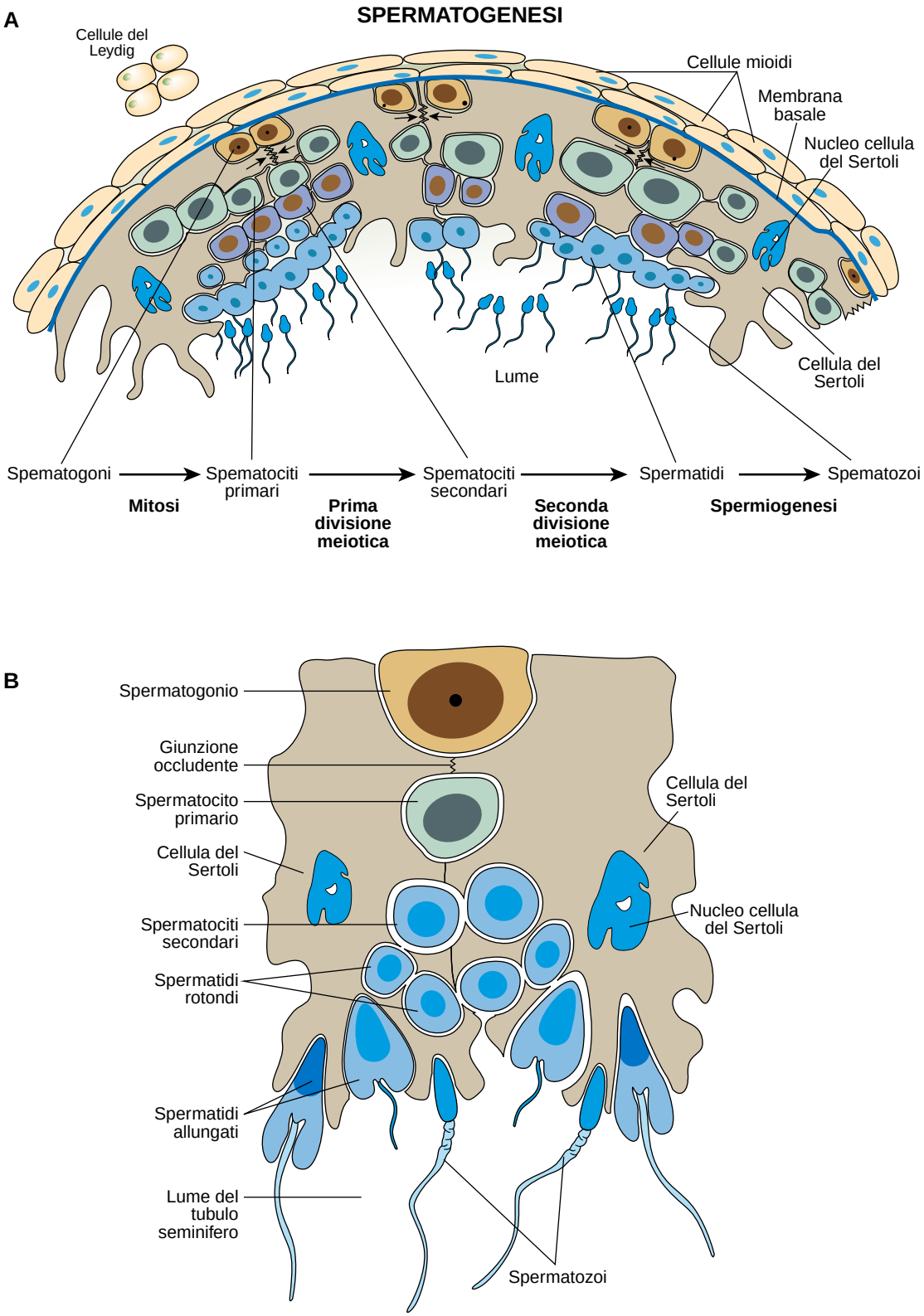



**Figura 6-2** ■ *A)* Disegno illustrante l'organizzazione strutturale dell'epitelio seminifero. Le frecce indicano le giunzioni occludenti tra cellule del Sertoli contigue che costituiscono la base anatomica della barriera emato-testicolare. La barriera emato-testicolare suddivide l'epitelio seminifero in due compartimenti: il compartimento basale ed il compartimento adluminale che affaccia verso il lume del tubulo. Notare che le cellule germinali nelle differenti fasi del loro differenziamento occupano diversi strati che sono progressivamente a stadi di sviluppo più avanzati dalla periferia al centro del tubulo. *B)* Due cellule del Sertoli che avvolgono le cellule germinali in vari stadi di differenziamento da spermatogonio a spermatozoo.

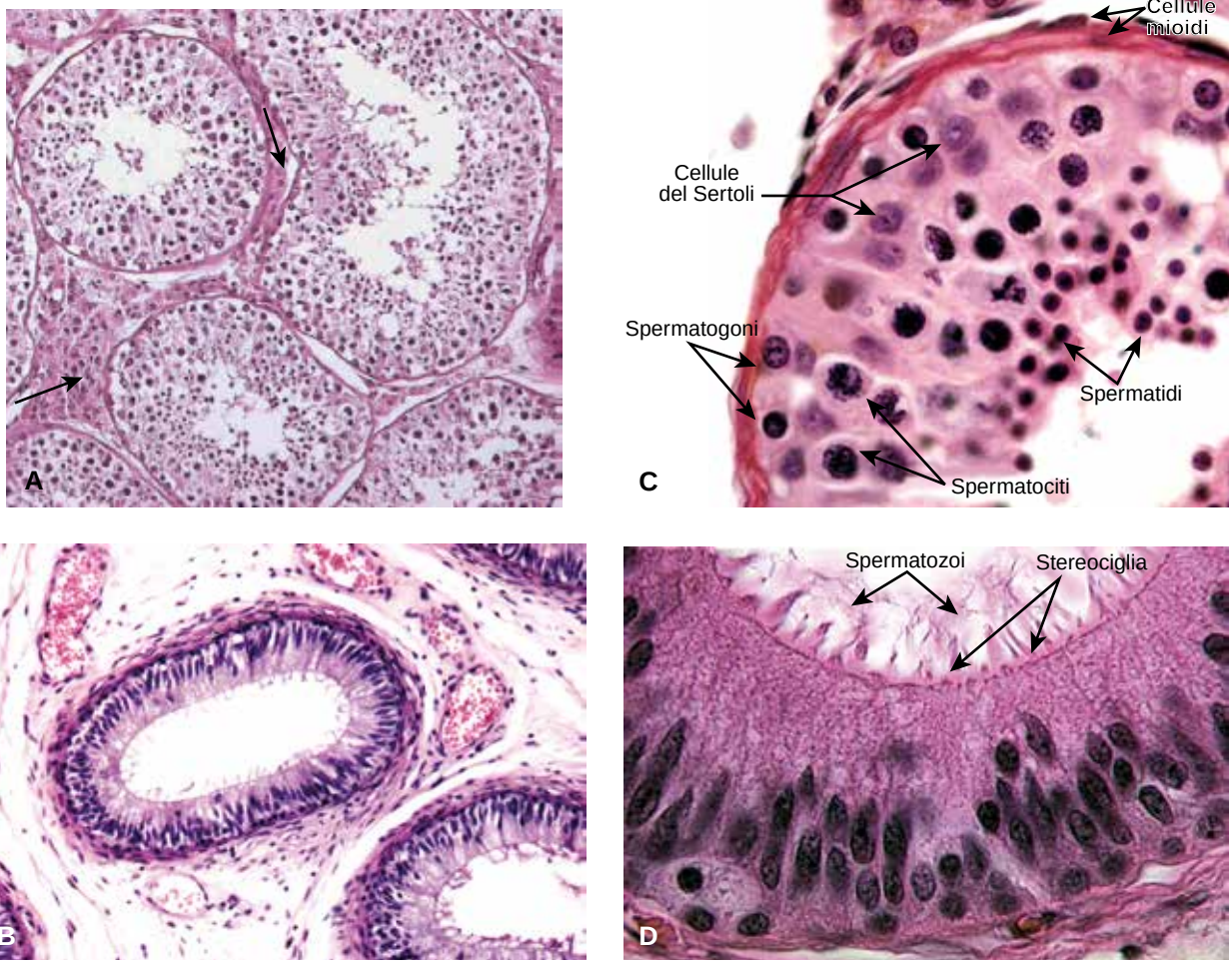



**Figura 6-3** ■ Fotografia al microscopio ottico di una sezione di testicolo *(A)* e di epididimo *(B)* umano. Le frecce in *A*, indicano il tessuto del compartimento interstiziale contenente vasi sanguigni e linfatici, fibroblasti e macrofagi e cellule del Leydig che producono testosterone. In *C* e *D* particolari delle sezioni a maggiore ingrandimento. Nei tubuli seminiferi in *C* sono visibili cellule germinali in momenti diversi del loro differenziamento. Notare in *D* la presenza di stereociglia sulla superficie apicale delle cellule dell'epitelio epididimale e la presenza di spermatozoi nel lume del canale dell'epididimo. (Fotografie di B. Muciaccia, Dipartimento di SAIMLAL, Sezione di Istologia ed Embriologia Medica, Sapienza Università di Roma)

attraversano il canale inguinale ed entrano a far parte del funicolo spermatico che contiene anche il dotto deferente nonché vasi venosi e linfatici. La rete capillare del testicolo viene drenata da un complesso di vene (gruppo venoso anteriore e posteriore), che ascendono lungo il funicolo spermatico e anastomizzandosi fra loro formano il cosiddetto plesso pampiniforme, che per graduale confluenza dei rami converge nella vena testicolare; quest'ultima, dal testicolo destro, sbocca nella vena cava inferiore e, dal testicolo sinistro, nella vena renale ad angolo retto (tale organizzazione anatomica predispone a una comune condizione patologica maschile, il **varicocele**). Il **plesso pampiniforme** delle vene, con una temperatura del sangue più bassa rispetto a quella del sangue arterioso, circonda l'arteria testicolare e questa peculiare disposizione è alla base del sistema di scambio di calore controcorrente (il passaggio di calore determina un raffreddamento del sangue arterioso) che permette il mantenimento di una temperatura differenziale tra il testicolo nello scroto (34-35 °C) e la temperatura intra-addominale di 37 °C. Inoltre, il calore testicolare può essere disperso direttamente nell'ambiente esterno grazie alla pelle scrotale, estremamente sottile e quasi priva di tessuto adiposo sottocutaneo. Quando i testicoli non migrano nello scroto durante lo sviluppo fetale, si presenta una condizione patologica nota come **criptorchidismo** (2-3% dei maschi alla nascita) (Fig. 6-4). La temperatura più elevata a cui si trova un testicolo ritenuto nell'addome è la causa di un blocco della spermatogenesi; testicoli criptor-

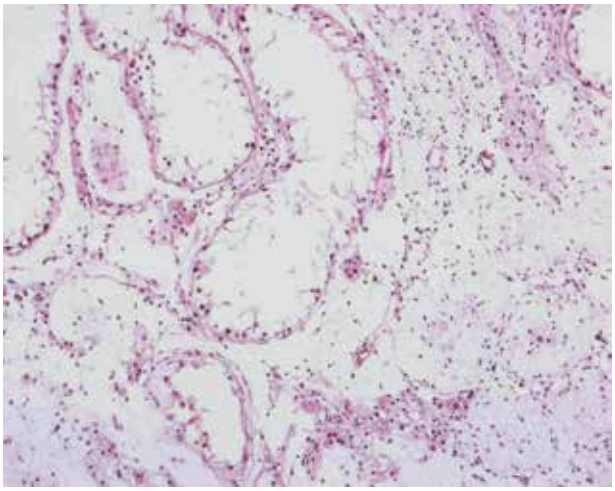


**Figura 6-4** ■ Fotografia al microscopio ottico di testicolo umano criptorchide. Notare l'assenza di cellule germinali all'interno dei tubuli e l'alterata istologia dell'epitelio seminifero. (Fotografia di B. Muciaccia, Dipartimento di SAIMLAL, Sezione di Istologia ed Embriologia Medica, Sapienza Università di Roma)

chidi sono inoltre associati ad un rischio maggiore di tumori testicolari (vedi paragrafo "Aspetti clinici").

## Sviluppo prepuberale del testicolo

Come verrà descritto nel Capitolo 16, durante la vita embrio-fetale i cordoni testicolari primitivi sono costituiti da tre tipi di cellule: le cellule germinali, denominate **prospermatogoni** o **gonociti**, le cellule di sostegno, cellule più piccole che costituiscono i precursori delle **cellule del Sertoli** e delle **cellule muscolari lisce peritubulari** (**cellule mioidi**). Nello stesso tempo, nel mesenchima dei testicoli si differenziano le cellule interstiziali che sono i precursori delle **cellule del Leydig**. Come detto in precedenza, la produzione di spermatozoi (**spermatogenesi**) inizia soltanto alla pubertà. Nel corso della vita embrio-fetale e prima della pubertà, tuttavia, le cellule germinali, le cellule del Sertoli e del Leydig vanno incontro a notevoli processi replicativi e fondamentali cambiamenti strutturali e funzionali. Nell'uomo la lunghezza dei cordoni aumenta in modo consistente dopo la nascita come riflesso della rapida proliferazione delle cellule del Sertoli. Durante l'infanzia, il numero di cellule germinali aumenta, ma con un tasso di crescita inferiore a quello delle cellule del Sertoli. La proliferazione e il differenziamento delle cellule del Sertoli e delle cellule germinali, nel periodo neonatale e nell'infanzia, è alla base dell'incremento in lunghezza dei cordoni seminiferi e dell'aumento volumetrico del testicolo. Nel critico periodo della pubertà le cellule del Sertoli cessano di dividersi, vanno incontro a modificazioni strutturali, divenendo cellule polarizzate allungate con la formazione di **giunzioni occludenti** tra le membrane laterali di cellule adiacenti (vedi paragrafo seguente). In questo periodo, esse iniziano a produrre un secreto fluido che provoca la trasformazione dei **cordoni seminiferi**, privi di lume fino a questo periodo, in **tubuli seminiferi** canalizzati. Il lume dei tubuli seminiferi si connette, quindi, con quello della *rete testis* e quest'ultima è poi in continuità con le susseguenti vie genitali. In questa fase, mentre le cellule del Sertoli escono definitivamente dal ciclo cellulare acquisendo le loro caratteristiche strutturali e funzionali tipiche, il processo della spermatogenesi prende avvio con un picco di proliferazione degli spermatogoni che si localizzano inizialmente intorno alla base delle cellule del Sertoli. L'efficienza e la qualità della spermatogenesi è, a questo punto, direttamente correlata al numero e alle funzioni delle cellule del Sertoli (vedi "Processi e molecole"). Una volta che il processo ha preso inizio, la progressione della spermatogenesi forza lo spostamento degli spermatociti meiotici e degli spermatidi verso il centro del tubulo seminifero, aumentando progressivamente il suo diametro.

Per quanto riguarda il compartimento interstiziale, nell'uomo sono state descritte tre fasi di crescita delle cellule del Leydig nel corso dello sviluppo testicolare. Nella prima fase, il picco massimo di sviluppo della popolazione di cellule del Leydig fetali avviene a 14-18 settimane di vita intrauterina; in questo periodo le cellule sintetizzano **testosterone**, responsabile della mascolinizzazione fetale, e **Insl-3** (insulin-like growth factor 3), necessario per la discesa dei testicoli. Le cellule del Leydig fetali degenerano, tuttavia, nel corso degli ultimi tre mesi di gravidanza. Un secondo ciclo di proliferazione è stato osservato nel primo trimestre dopo la nascita contemporaneamente al picco postnatale di **LH/testosterone**. L'ultima ondata di crescita coincide con lo sviluppo puberale e porta alla formazione di una popolazione di cellule del Leydig adulte. Nell'uomo il compartimento interstiziale rappresenta circa il 12-15% del volume del testicolo adulto. Il 10-20% dell'interstizio è occupato dalle cellule del Leydig (i testicoli umani contengono approssimativamente 200 milioni di cellule del Leydig).

## Epitelio seminifero

I tubuli seminiferi nell'adulto sono formati da un complesso epitelio stratificato, l'**epitelio seminifero**, costituito da varie generazioni di cellule germinali nel corso del loro processo differenziativo fino a spermatozoi e da cellule somatiche, le cellule del Sertoli. I tubuli sono delimitati da una tonaca propria, di 3-5 µm di spessore, costituita da una membrana basale e diversi strati di **cellule muscolari lisce peritubulari** (**cellule mioidi**) (Figg. 6-2 e 6-3). Le cellule germinali nel corso del loro differenziamento occupano differenti strati che sono progressivamente a stadi di sviluppo più avanzati dalla periferia al centro del tubulo (Figg. 6-2 e 6-3).

Le **cellule del Sertoli**, mirabilmente descritte per la prima volta al microscopio ottico da Enrico Sertoli nel 1865 come "cellule ramificate", costituiscono gli elementi somatici dell'epitelio seminifero. Esse si presentano di

forma colonnare vagamente triangolare, con la base in contatto con la membrana basale e la porzione apicale protesa verso il lume del tubulo seminifero. Le cellule sono strutturalmente organizzate con un complesso sistema di prolungamenti citoplasmatici simili ai rami di un albero che avvolgono ogni singola cellula germinale e la accompagnano durante tutto il suo percorso differenziativo fino alla fine della spermiogenesi. Il nucleo delle cellule è ovoidale con profondi solchi alla sua superficie; la cromatina è finemente dispersa ed è evidente un grande nucleolo centrale (Fig. 6-2).

Le cellule del Sertoli rivestono un ruolo cruciale nel processo della spermatogenesi e questa fondamentale funzione è dimostrata dal fatto che: 1) non sono mai stati osservati testicoli costituiti da sole cellule germinali; 2) il numero di cellule germinali e la produzione di spermatozoi è direttamente correlato alla popolazione di cellule del Sertoli (vedi "Processi e molecole"). Le differenti funzioni delle cellule del Sertoli includono: 1) un sostegno strutturale nonché nutritivo alle cellule germinali; 2) la fagocitosi di cellule germinali in degenerazione e di corpi residuali degli spermatidi; 3) la regolazione del rilascio degli spermatozoi alla spermiazione; 4) la secrezione di una serie di molecole che mediano l'azione dell'**FSH** (follicle stimulating hormone) prodotto dall'ipofisi e che regolano il differenziamento e l'attività mitotica/meiotica delle cellule germinali (vedi paragrafo "Processi e molecole"); 5) protezione delle cellule germinali autoantigeniche dal sistema immunitario (vedi paragrafo "Il privilegio immunitario del testicolo").

Una fondamentale caratteristica delle cellule del Sertoli è costituita dalla formazione della cosiddetta **barriera ematо-testicolare**. Infatti, in prossimità della loro regione basale le membrane laterali di cellule del Sertoli adiacenti sono connesse da giunzioni occludenti che si estendono intorno a tutto il perimetro delle cellule. Questo particolare dispositivo di giunzione sigilla le cellule tra loro rendendo gli spazi intercellulari inaccessibili anche alle molecole. In conseguenza di ciò, la barriera ematо-testicolare (formata dalle giunzioni occludenti tra cellule del Sertoli) suddivide l'epitelio seminifero in due compartimenti: il **compartimento basale** ed il **compartimento adluminale** che affaccia verso il lume del tubulo. La presenza della barriera, quindi, segrega le cellule germinali in due differenti e definiti microambienti: gli spermatogoni e gli spermatociti primari in preleptotene, nel compartimento basale; gli spermatociti in meiosi e le cellule germinali post-meiotiche, spermatidi e spermatozoi, nel compartimento adluminale. La barriera ostacola qualsiasi diffusione di fluido dall'interstizio e quindi, mentre il compartimento basale è accessibile al fluido interstiziale che origina dai vasi sanguigni, il compartimento adluminale è isolato ed è invece pervaso dal fluido tubulare che è secreto dalle cellule del Sertoli (il fluido tubulare si differenzia nettamente nella sua composizione chimica rispetto al fluido interstiziale). La meiosi e la spermiogenesi procedono, quindi, in uno specifico microambiente tubulare isolato dal compartimento vascolare-interstiziale e avvengono in stretta ed esclusiva connessione con le cellule del Sertoli. Queste riforniscono le cellule germinali con nutrienti specifici e substrati energetici quali lattato e piruvato ed alcune proteine. La complessa organizzazione strutturale determinata dalla barriera stabilisce, inoltre, una **barriera immunologica**, isolando le cellule germinali meiotiche e post-meiotiche dal sistema immunitario (vedi paragrafo "Il privilegio immunitario del testicolo").

La presenza della barriera impone, comunque, l'esistenza di fini meccanismi di regolazione della selettiva permeabilità e dinamicità delle giunzioni occludenti che permettono agli spermatociti, durante la transizione tra fase mitotica e meiotica, di migrare dal compartimento basale a quello adluminale. Si tratta di un processo molto complesso che comporta l'apertura temporanea delle giunzioni tra le cellule del Sertoli e la loro immediata chiusura subito dopo il transito dello spermatocita in prelepotene. Inoltre devono avvenire una serie di interazioni adesive tra lo spermatocito e la cellula del Sertoli che consentono il movimento della cellula germinale. Studi recenti nel topo hanno, infatti, dimostrato che la citochina **TNF-α** secreta dalle Sertoli regola l'apertura temporanea e la riformazione delle giunzioni occludenti proprio durante la migrazione degli spermatociti da un compartimento all'altro. Speciali proteasi chiamate **metalloproteasi** (enzimi che richiedono zinco o cobalto per la loro attività), prodotte dalle cellule germinali svolgono pure un ruolo importante nell'apertura delle giunzioni. Diversi strati di cellule mioidi rivestono i tubuli seminiferi esternamente alla membrana basale. Queste cellule sono responsabili delle contrazioni ritmiche peritubulari necessarie per la progressione degli spermatozoi (non ancora dotati di motilità) verso l'ilo della gonade. A questo proposito è stato dimostrato che nel topo l'**endotelina** (una citochina di 21 amminoacidi ad azione locale vasoattiva) prodotta dalle cellule del Sertoli stimola l'attività contrattile delle cellule mioidi. Inoltre, lo strato di cellule mioidi potrebbe, anche nell'uomo, contribuire alla formazione dello sbarramento fisico-chimico della barriera ematо-testicolare.

## SPERMATOGENESI

La spermatogenesi è il processo durante il quale gli **spermatogoni** si differenziano in cellule altamente specializzate, gli **spermatozoi**. È stato calcolato che in un individuo adulto giovane possono essere prodotti nei due testicoli circa 500-1000 spermatozoi al secondo! La spermatogenesi ha inizio alla pubertà e continua ininterrottamente per tutta la vita, anche se, in età più avanzate, si assiste ad una consistente diminuzione d'alcuni parametri del liquido seminale (volume e conta totale degli spermatozoi per eiaculato e graduale riduzione della motilità degli spermatozoi). Un picco di proliferazione degli spermatogoni e la comparsa di spermatociti meiotici sono considerati i primi segni di maturazione puberale dei tubuli seminiferi. Nell'uomo l'intervallo di tempo tra la divisione mitotica dello **spermatogonio Ap** (p = pale, vedi paragrafo seguente) con destino differenziativo e la spermiazione finale dello spermatozoo ha una durata media di circa 74 giorni.

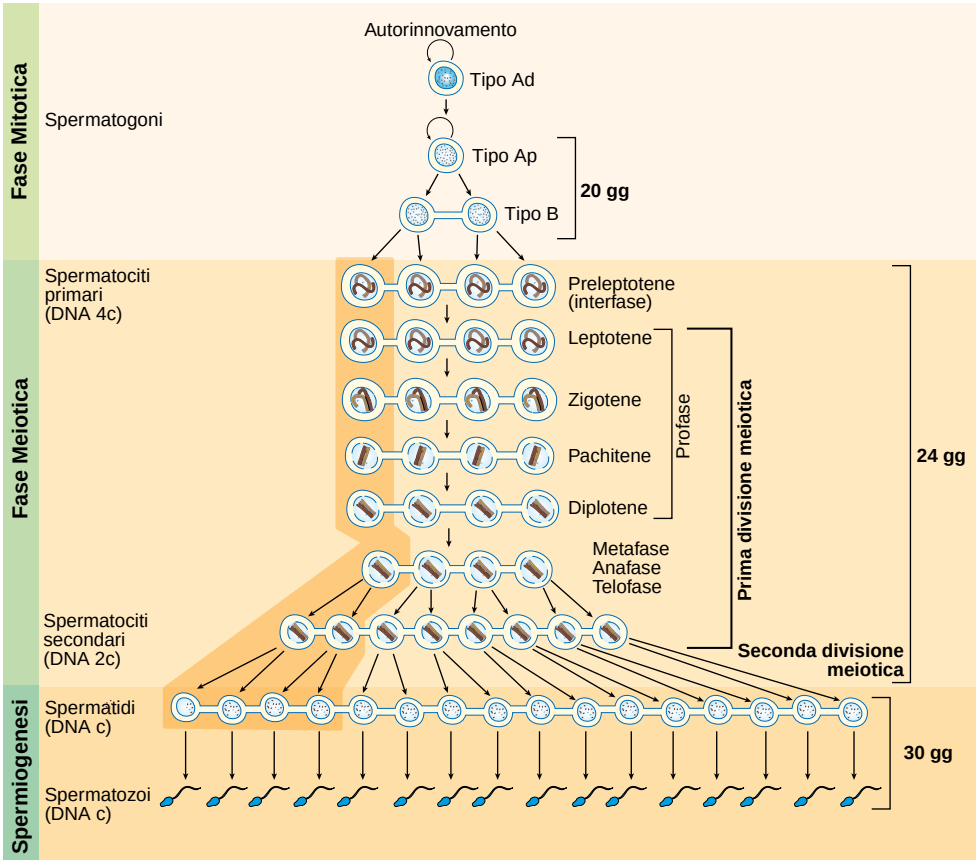



**FIGURA 6-5** ■ Schema generale della spermatogenesi umana. Gli spermatogoni Ad (Adark, cellule staminali di riserva) e gli spermatogoni Ap (Apale, cellule staminali progenitrici) costituiscono la riserva staminale di cellule germinali e sono entrambi dotati di autorinnovamento. Nella fase mitotica gli spermatogoni Ap proliferano attivamente in periodi definiti nel corso di ogni ciclo dell'epitelio seminifero producendo sia spermatogoni Ap sia spermatogoni B. Gli spermatogoni B, attraverso un'ulteriore divisione mitotica, danno origine agli spermatociti primari in preleptotene che, dopo la duplicazione del loro DNA, entreranno nella I divisione meiotica. La meiosi procede con la I divisione attraverso gli stadi della I profase (leptotene, zigotene, pachitene, diplotene), metafase, anafase e telofase, producendo cellule più piccole, gli spermatociti secondari. Questi, che hanno un numero aploide di cromosomi ma ciascuno composto da due cromatidi (e quindi con contenuto di DNA 2c), entrano nella II divisione meiotica dando origine agli spermatidi. Gli spermatidi rotondi hanno un diametro nucleare di circa la metà di quello degli spermatociti primari. Nella fase della spermiogenesi, lo spermatide va incontro ad un complesso processo di maturazione, senza ulteriori divisioni, che risulterà nella trasformazione di una cellula rotonda in una cellula altamente polarizzata, lo spermatozoo. Nell'uomo l'intervallo di tempo tra la divisione mitotica dello spermatogone Ap con destino differenziativo e la spermiazione finale dello spermatozoo ha una durata media di circa 74 giorni. In evidenza a sinistra (area più scura) le fasi meiotiche che riguardano un singolo spermatocito primario. A destra è indicata la durata in giorni della fase mitotica, meiotica e della spermiogenesi. Notare che da un Ap che differenzia si formano 16 spermatozoi.

La spermatogenesi può essere schematicamente suddivisa in tre fasi: la **fase mitotica**, la **fase meiotica** e la **spermiogenesi** (Fig. 6-5).

## La fase mitotica della spermatogenesi

Nella fase mitotica, che si estende per circa 20 giorni**,** avviene la proliferazione e il differenziamento degli spermatogoni. Gli spermatogoni rappresentano una popolazione di cellule che dividendosi per mitosi dà luogo sia a una popolazione (che si autorinnova) di cellule staminali spermatogoniali, sia a cellule germinali destinate ad entrare nella fase meiotica. In mancanza di specifici marcatori fenotipici o biochimici, l'identificazione dei tipi differenti di spermatogoni risulta abbastanza complessa. Attualmente la classificazione degli spermatogoni dipende essenzialmente dalle caratteristiche morfologiche dei loro nuclei e particolarmente della cromatina. Nell'uomo sono stati identificati due tipi di **spermatogoni staminali** morfologicamente distinguibili: **Ad** (**spermatogoni A *dark***), con colorazione della cromatina omogenea ed intensa ad eccezione di una piccola area rotondeggiante più chiara, e **Ap** (**spermatogoni A *pale***) con cromatina finemente dispersa e colorazione uniforme e pallida (Fig. 6-6). Anche se entrambi i tipi sono considerati cellule staminali spermatogoniali, alcuni au-

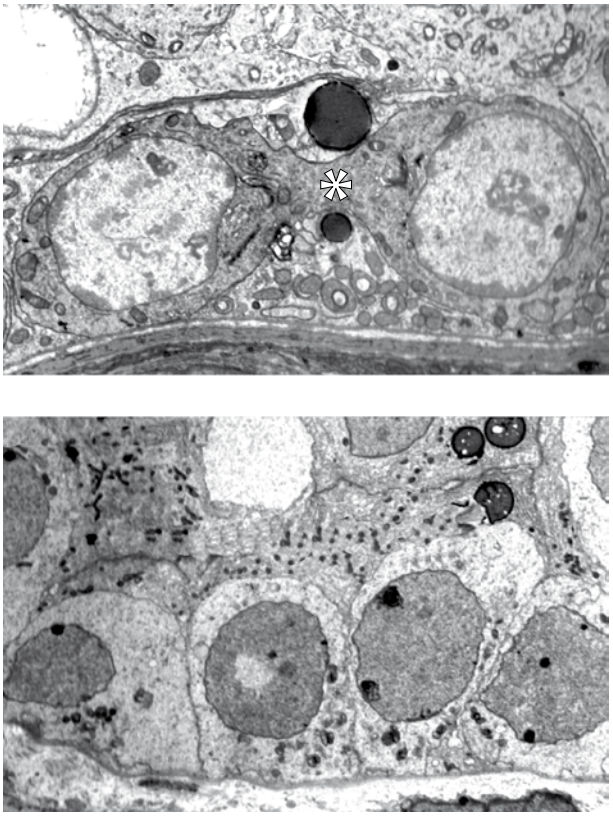


**Figura 6-6** ■ Fotografie al microscopio elettronico di spermatogoni umani. In alto due spermatogoni Ap e in basso alcuni Ad; notare la diversa densità della cromatina e la presenza in uno degli Ad di una piccola area tondeggiante chiara. È ben visibile il ponte citoplasmatico che unisce i due spermatogoni Ap (asterisco). (Fotografie di L. Zamboni)

tori ritengono che solo gli spermatogoni Ad possiedano caratteristiche di vere cellule staminali del testicolo. Gli spermatogoni Ap presentano, invece, tipiche caratteristiche di cellule staminali progenitrici (le cellule progenitrici, comunque dotate di autorinnovamento, sono una popolazione di cellule intermedia tra le cellule staminali e le cellule differenziate, vedi Capitolo 4 e "Processi e molecole" di questo capitolo). Gli spermatogoni Ad, come tipiche cellule staminali di riserva, mostrano un basso indice mitotico; al contrario, gli spermatogoni Ap proliferano attivamente in periodi definiti nel corso di ogni ciclo dell'epitelio seminifero (vedi paragrafo seguente) producendo sia spermatogoni Ap sia spermatogoni B (Fig. 6-5). Gli spermatogoni B, attraverso un'ulteriore divisione mitotica, danno origine agli spermatociti primari in preleptotene che, dopo la duplicazione del loro DNA, entrano nella prima divisione meiotica. Nell'uomo il numero delle divisioni mitotiche degli spermatogoni è di gran lunga inferiore a quello nel topo. Peraltro nell'uomo tale numero è difficilmente misurabile a causa della grande variabilità che si osserva nella nostra specie (vedi più avanti e la Figura 6-17). Il basso indice di attività mitotica, in condizioni normali, degli spermatogoni Ad favorisce la fondamentale e biologicamente cruciale salvaguardia dell'integrità genomica della linea germinale. È interessante sottolineare che gli spermatogoni Ap destinati al differenziamento non completano la citodieresi. Difatti, le cellule germinali che derivano da un Ap formano un clone, nell'ambito del quale le cellule sono in comunicazione mediante **ponti citoplasmatici intercellulari** (Fig. 6-6). Questa continuità citoplasmatica si mantiene per tutta la durata della spermatogenesi. Le cellule germinali infatti acquisiscono la loro individualità solo alla **spermiazione** quando, allo stadio finale di spermatozoo, si distaccano dall'epitelio seminifero rimanendo libere nel lume del tubulo. Le incomplete divisioni mitotiche e meiotiche potrebbero essere uno dei meccanismi responsabili della sincronia di sviluppo dello stesso clone/generazione di cellule germinali che si osserva nell'epitelio seminifero (vedi paragrafo seguente). Inoltre, la continuità citoplasmatica tra cellule dello stesso clone consente una distribuzione equilibrata di differenti prodotti genici, che a seguito del processo meiotico sarebbero altrimenti asimmetricamente distribuiti nelle cellule figlie.

Bisogna sottolineare che non tutte le cellule germinali sopravvivono nel corso della spermatogenesi. Nel testicolo umano, infatti, una grande proporzione (circa 1/3) di cellule germinali degenera per **apoptosi** e i meccanismi che regolano questo attivo processo di morte cellulare costituiscono dei fondamentali *check points* del controllo di qualità della spermatogenesi.

## La fase meiotica della spermatogenesi

La meiosi consiste di due successive divisioni cellulari precedute da una sola duplicazione del DNA (vedi Capitolo 5). La **fase meiotica** ha inizio a partire dagli spermatociti primari in **preleptotene** (interfase) che duplicano il loro DNA, i cromosomi si condensano e si rendono evidenti come lunghi ed esili filamenti nel nucleo (ogni cromosoma è costituito da due cromatidi) e questa caratteristica identifica lo stadio di **leptotene** della I profase meiotica. Nel successivo stadio di **zigotene** si appaiano i cromosomi omologhi. Il nucleo di queste cellule, quindi, aumenta di volume e l'ulteriore condensazione dei cromosomi omologhi (denominati bivalenti o tetradi) conferisce quelle caratteristiche nucleari che permettono di identificare le cellule come spermatociti primari allo stadio di **pachitene**. A questo stadio avviene l'interscambio (**crossing-over**) di materiale genetico tra i cromatidi di origine paterna e quelli di origine materna. I siti di scambio appaiono nettamente come punti di unione (**chiasmi**) quando i cromosomi omologhi si separano allo stadio di **diplotene**. Nelle fasi più avanzate della profase meiotica, gli spermatociti primari (pachitene e diplotene) sono le cellule più grandi dell'epitelio seminifero.

Durante lo stadio di pachitene, la cromatina dei cromosomi sessuali X e Y subisce un processo di inattivazione trascrizionale; in questa fase i geni situati su questi cromosomi devono essere silenziati. Osservando al microscopio ottico una preparazione dei cromosomi di

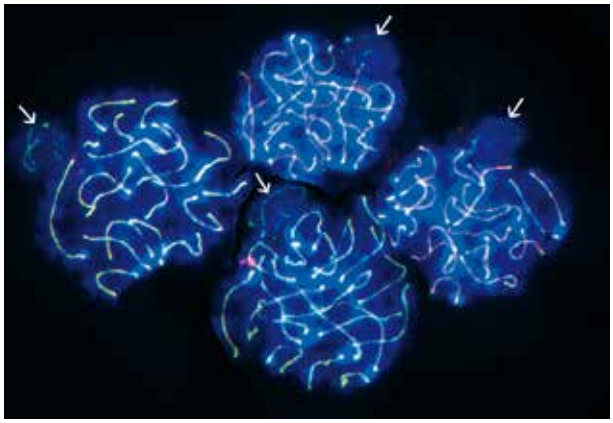


**Figura 6-7** ■ Fotografia al microscopio ottico a fluorescenza di preparazioni di cromosomi da spermatociti in meiosi. Vengono mostrati quattro spermatociti allo stadio di pachitene in cui anticorpi contro le proteine del complesso sinaptinemale SCP2 e SCP3 permettono di identificare i cromosomi. I cromosomi XY (vescicola sessuale) sono indicati dalle frecce. (Fotografia per gentile concessione di M. Barchi, Dipartimento di Biomedicina e Prevenzione, Università di Roma Tor Vergata)

spermatociti è possibile riconoscere i cromosomi X e Y appaiati, ma solo parzialmente adesi tra loro, localizzati in una piccola regione chiamata "vescicola sessuale" (Fig. 6-7).

Al termine della profase scompare l'involucro nucleare ed inizia la metafase; i cromosomi omologhi si separano spostandosi verso i due poli della cellula (anafase) e al termine della successiva telofase si hanno due spermatociti secondari (che contengono un numero aploide di cromosomi dicromatidici). Dopo una breve interfase di circa 6 ore, gli spermatociti secondari iniziano la seconda divisione meiotica, durante la quale i cromatidi di ogni cromosoma si separano, formando gli spermatidi rotondi (quattro per ogni spermatocito primario). La seconda divisione meiotica è sostanzialmente identica ad una divisione mitotica ma non è preceduta dalla duplicazione del DNA. Quindi per ogni spermatogonio Ap che entra nel processo differenziativo si formano 16 spermatidi. L'intero processo meiotico nell'uomo richiede circa 24 giorni.

## La terza fase della spermatogenesi: la spermiogenesi

Nell'ultima fase della spermatogenesi, lo spermatide va incontro ad un complesso processo di maturazione che risulterà nella trasformazione di una cellula rotonda in una cellula altamente polarizzata, lo spermatozoo. Questo processo, che avviene senza ulteriori divisioni cellulari, viene denominato **spermiogenesi** e dura circa 30 giorni. Nelle varie fasi della spermiogenesi si differenziano strutture specifiche come il **flagello** e l'**acrosoma**, che svolgono un ruolo essenziale nella fecondazione. I passaggi fondamentali, invariabili tra tutte le specie, che caratterizzano la spermiogenesi sono: i) la formazione dell'acrosoma; ii) modificazioni del nucleo e della forma della cellula; iii) formazione del flagello; iv) eliminazione del citoplasma in eccesso e nuova organizzazione degli organelli cellulari; v) condensazione della cromatina; vi) rilascio degli spermatozoi da parte delle cellule del Sertoli nel lume del tubulo seminifero (spermiazione).

La spermiogenesi può essere schematicamente suddivisa in quattro fasi: la **fase del Golgi**; la **fase del cappuccio**; la **fase acrosomale**; la **fase di maturazione** (Fig. 6-8). Durante la fase del Golgi inizia la formazione dell'acrosoma; una serie di granuli, denominati granuli proacrosomici, che originano dal complesso di Golgi confluiscono formando un'unica vescicola acrosomica. Nella fase del cappuccio la vescicola acrosomica diventa

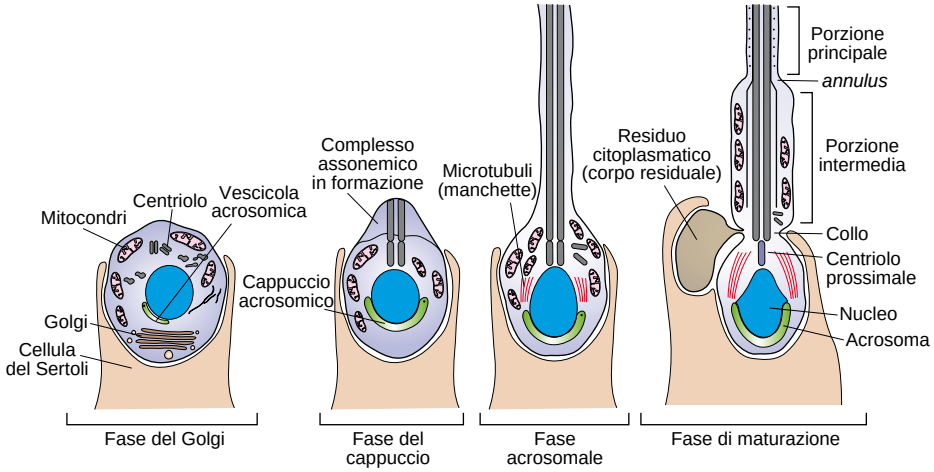



**Figura 6-8** ■ Rappresentazione schematica che illustra le modificazioni strutturali a cui vanno incontro gli spermatidi durante le quattro fasi del processo differenziativo della spermiogenesi. Vedi testo per i dettagli.

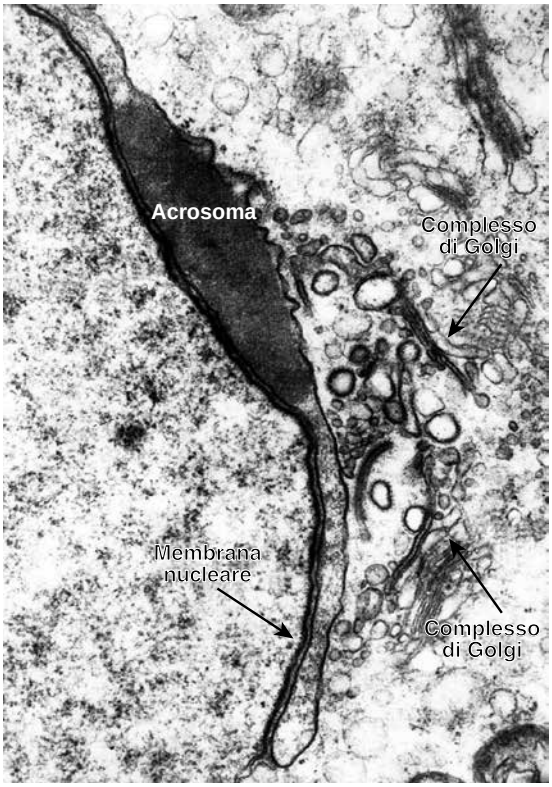



**Figura 6-9** ■ Fotografia al microscopio elettronico di sezione di spermatide umano nella fase del cappuccio della spermiogenesi. (Da: L. Zamboni)

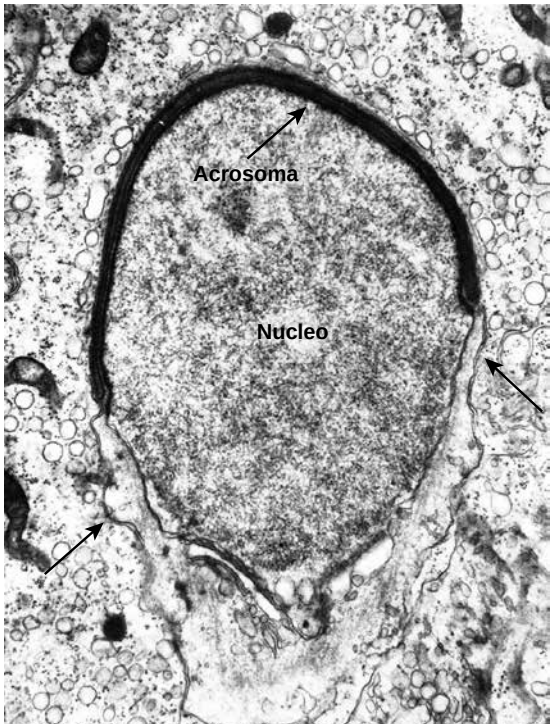



**Figura 6-10** ■ Fotografia al microscopio elettronico di sezione di spermatide umano nella fase acrosomale della spermiogenesi. Lo spermatide è avvolto da espansioni citoplasmatiche della cellula del Sertoli. Le frecce indicano le membrane affrontate dello spermatide e della cellula del Sertoli. (Fotografia di L. Zamboni).

più grande e va a rivestire circa i 2/3 anteriori della superficie nucleare (cappuccio acrosomico) (Fig. 6-9). I due centrioli (prossimale e distale) si dispongono al polo del nucleo opposto al granulo acrosomico. La fase acrosomale si caratterizza per le considerevoli modificazioni dell'acrosoma, del nucleo e del flagello (Fig. 6-10). Il nucleo si dispone in stretta apposizione con la membrana cellulare nella regione rivestita dal cappuccio acrosomico. La formazione del flagello prende avvio dal centriolo prossimale (il centriolo distale degenera) e i mitocondri migrano verso l'assonema disponendosi intorno al suo tratto prossimale. In questa fase, un fascio di microtubuli, denominato ***manchette,*** si estende dal cappuccio acrosomico verso il flagello in formazione. Nell'ultima fase di maturazione, lo spermatide completa il differenziamento in spermatozoo e la testa acquisisce la peculiare struttura specie-specifica che nell'uomo si presenta come ovalare (Fig. 6-11).

Nel corso delle ultime fasi della spermiogenesi si verifica una progressiva condensazione della cromatina che diviene molto compatta. La condensazione della cromatina rappresenta l'espressione morfologica di notevoli modificazioni biochimiche che determinano la stabilizzazione del DNA, favorendo una riduzione del volume nucleare, un sostanziale blocco della trascrizione e resistenza del DNA alla digestione. Queste modificazioni del DNA sono accompagnate dalla sostituzione delle

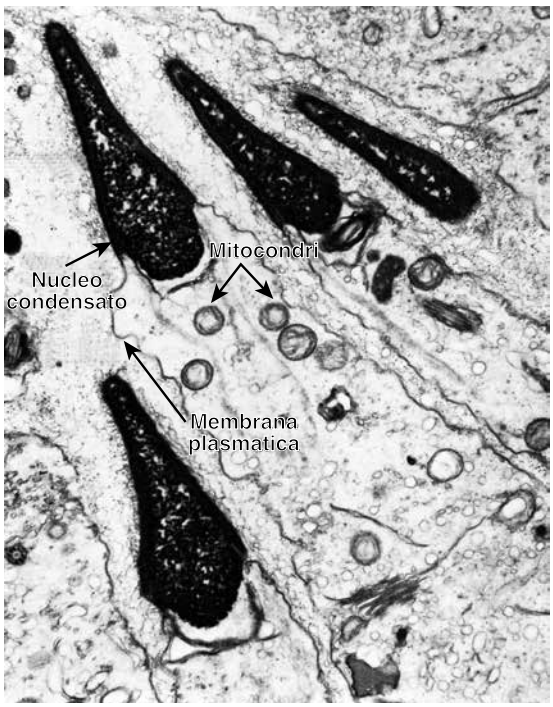



**Figura 6-11** ■ Fotografia al microscopio elettronico di sezione di spermatidi umani verso la fine della fase di maturazione della spermiogenesi. (Fotografia di L. Zamboni)

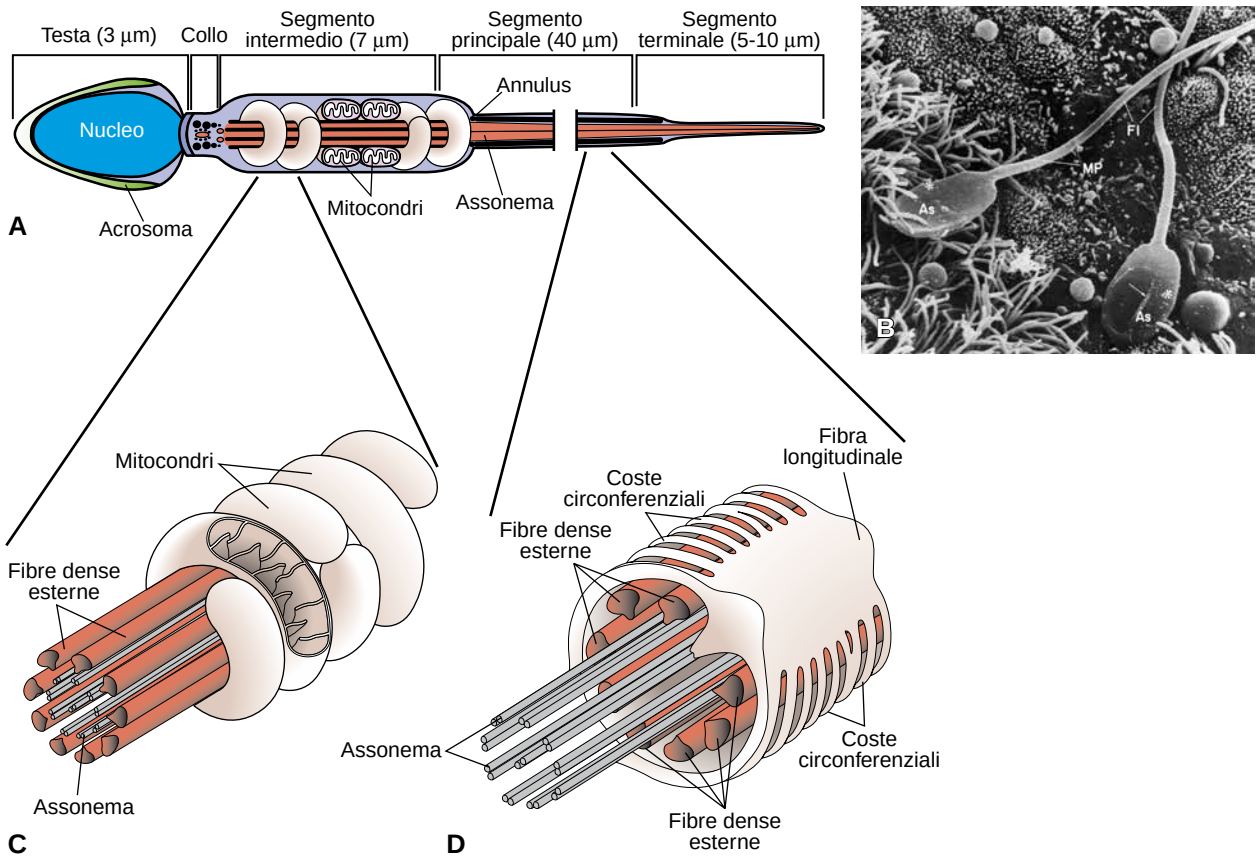



**Figura 6-12** ■ *A)* Rappresentazione schematica dello spermatozoo umano. *B)* Fotografia al microscopio elettronico a scansione di spermatozoi umani distesi sull'epitelio dell'utero; notare la testa a forma di pera appiattita, l'acrosoma (As), i flagelli (Fl) e la porzione intermedia del flagello (MP). *C)* Disegno ricavato da osservazioni al microscopio elettronico del tratto intermedio del flagello; osservare le 9 fibre dense, i mitocondri e l'assonema. *D)* Disegno ricavato da osservazioni al microscopio elettronico del tratto principale del flagello; osservare le colonne longitudinali, le coste circonferenziali, le fibre dense e l'assonema. (L'immagine *B* è tratta da P. Motta, P.M. Andrew, K.R. Porter, Atlante di anatomia microscopica elettronica a scansione, Casa Editrice Dr. Francesco Vallardi, Milano, 1977)

proteine istoniche con proteine molto basiche e ricche di arginina, le **protamine**.

Alla fine della spermiogenesi e subito prima della spermiazione, la maggior parte del citoplasma residuo dello spermatide, che si è andato a localizzare in posizione caudale intorno alla coda, viene eliminato dalla cellula, costituendo i **corpi residuali** che sono fagocitati dalle cellule del Sertoli.

## Struttura degli spermatozoi

I componenti principali di uno spermatozoo maturo sono il nucleo e l'acrosoma, che costituiscono la **testa** e il **flagello**, che forma la coda lunga circa 60-70 µm (Fig. 6-12). La testa dello spermatozoo umano, lunga circa 3 µm, presenta una forma a pera leggermente appiattita. Il nucleo con assetto cromosomico aploide (23 cromosomi) appare compatto e contiene cromatina estremamente condensata e trascrizionalmente inattiva. L'acrosoma è una vescicola che ricopre circa i 2/3 anteriori del nucleo. È costituito da una **membrana acrosomale esterna**, al di sotto e in intimo contatto con la membrana plasmatica, e una **membrana acrosomale interna** accostata alla membrana nucleare. Dall'acrosoma sono stati isolati numerosi enzimi litici di origine lisosomale che vengono liberati nel corso della cosiddetta **reazione acrosomale** permettendo il transito dello spermatozoo attraverso la **zona pellucida** durante la fecondazione (vedi Capitolo 8). Il flagello o coda può essere suddiviso in quattro regioni strutturalmente distinguibili: un **collo**, un **segmento intermedio**, un **segmento principale** ed un **segmento terminale**. Il collo dello spermatozoo è un piccolo tratto della coda lungo circa 1 µm e contiene un centriolo in posizione trasversale rispetto all'asse di simmetria dello spermatozoo (l'altro centriolo è scomparso dopo aver dato origine al flagello), e una placca basale di materiale denso dalla quale originano 9 colonne longitudinali fibrose a costituzione proteica che si continuano fino al segmento principale (**fibre dense esterne**). Le fibre dense esterne, numerate da 1 a 9, sono coinvolte nel ripiegamento del flagello; l'assenza di queste strutture ne modifica, infatti, la flessibilità e questo risulta nell'al-

terazione del battito flagellare causando sterilità. Le fibre dense esterne circondano l'**assonema** (organizzazione microtubulare 9 + 2) che si estende fino all'estremità del flagello. A livello del tratto intermedio è presente una guaina di circa 100 mitocondri allungati e strettamente associati che, con andamento elicoidale, circonda le fibre esterne (Fig. 6-12C). Il limite tra segmento intermedio e segmento principale è distinto da un chiaro restringimento del diametro della coda e da una struttura anulare, denominata ***annulus*** (anello di materiale denso che crea un ispessimento della membrana plasmatica). Nel segmento principale, che è anche il tratto più lungo della coda, la guaina fibrosa presenta un aspetto del tutto diverso da quella del tratto intermedio. Infatti qui due colonne longitudinali, l'una dorsale e l'altra ventrale, sono collegate tra loro da una serie di coste circonferenziali. Le due colonne longitudinali corrispondono alle fibre dense 3 e 8 del tratto intermedio (Fig. 6-12D). Il segmento terminale della coda è poi costituito esclusivamente dall'assonema rivestito dalla membrana plasmatica.

La valutazione della morfologia degli spermatozoi può essere eseguita a fresco e dopo fissazione/colorazione fa parte di un'analisi chiamata **spermiogramma** o **spermiocitogramma**. In questa analisi vengono valutati oltre alla morfologia, la quantità e la motilità degli spermatozoi nonché le caratteristiche chimico-fisiche del plasma seminale (liquido seminale senza le cellule) (Tabella 1 e il paragrafo "Aspetti clinici" del Capitolo 8).

## CICLO E ONDA DELL'EPITELIO SEMINIFERO

Nell'uomo e anche in altri mammiferi dove l'accoppiamento non è stagionale, la spermatogenesi è un processo continuo che, come abbiamo visto, richiede circa 74 giorni affinché vengano prodotti spermatozoi a partire da spermatogoni Ap. La produzione continua di spermatozoi è proprio una conseguenza del fatto che l'inizio del processo della spermatogenesi, a livello di specifiche aree del tubulo seminifero, è discontinuo nel tempo e nello spazio: viene comunemente riportato, infatti, che "*l'onda dell'epitelio seminifero è nello spazio ciò che il ciclo dell'epitelio seminifero è nel tempo*".

Per comprendere il significato di questa affermazione è necessario fare alcune considerazioni:

1) nel testicolo gruppi di cellule germinali (spermatogoni Ap) si sviluppano in maniera sincronizzata e le cellule che si trovano tutte nella stessa fase di sviluppo vengono identificate come una *generazione* di cellule germinali;
2) in piccole aree circoscritte dei tubuli seminiferi, ogni 16 giorni per ogni specifica area del tubulo, una generazione di spermatogoni Ap inizia simultaneamente la spermatogenesi e una volta avviato, il processo di sviluppo procede a velocità costante;
3) poiché la durata della spermatogenesi (circa 74 giorni) è molto più lunga dell'intervallo di tempo fra due successive generazioni di spermatogoni che iniziano la spermatogenesi in una specifica area del tubulo, differenti generazioni di cellule germinali in corso di differenziamento sono stratificate nell'epitelio seminifero e la generazione più giovane occupa lo spazio più vicino alla membrana basale;
4) da quanto esposto, appare evidente che in ogni area circoscritta di tubulo seminifero si sviluppano simultaneamente 4-5 generazioni di cellule germinali, sfasate tra loro di un intervallo di 16 giorni;
5) è importante sottolineare che gli spermatogoni Ap entrano nella fase mitotica in momenti diversi nelle differenti aree di tubulo.

L'associazione di queste diverse generazioni di cellule in corso di differenziamento, nella stessa area di tubulo, sono definite **associazioni cellulari** o **stadi**. L'epitelio seminifero umano presenta 6 differenti quadri di associazioni cellulari che vengono indicate con un numero romano e corrispondono ai vari stadi del ciclo dell'epitelio seminifero (Fig. 6-13). La sequenza completa delle varie associazioni cellulari dei tubuli seminiferi è definito, infatti, come **ciclo dell'epitelio seminifero**. Il ciclo dell'epitelio seminifero è anche definito come l'arco di tempo che trascorre tra le due successive comparse della medesima associazione cellulare in una specifica area del tubulo seminifero. Questo significa che in ogni specifica area di tubulo seminifero vedremo ricomparire la stessa associazione cellulare ogni 16 giorni. Affinché uno spermatogonio Ap completi la spermatogenesi dopo 74 giorni e si differenzi in spermatozoo, sono quindi richiesti 4,6 cicli dell'epitelio seminifero.

Una recente e dettagliata analisi, basata sullo sviluppo dell'acrosoma, ha consentito di identificare 12 differenti associazioni cellulari, anziché 6, aprendo la possibilità di comprendere meglio i meccanismi patogenetici della spermatogenesi umana.

Nella maggior parte dei mammiferi, ma non nell'uomo, le diverse associazioni cellulari (stadi dell'epitelio seminifero) si estendono per tutta la circonferenza del tubulo seminifero e si presentano in successione in modo ordinato lungo il tubulo occupando tratti di differente lunghezza (Fig. 6-14A). L'**onda dell'epitelio seminifero** è definita, quindi, da una serie completa di tratti adiacenti di tubulo seminifero contenente tutte le specifiche associazioni cellulari del ciclo. Nell'uomo le associazioni cellulari (stadi del ciclo dell'epitelio seminifero) non si estendono sull'intera circonferenza del tubulo, come nei roditori, ma occupano circoscritte e numerose aree dell'epitelio seminifero (Fig. 6-14B,C); in una sezione trasversale di tubulo seminifero umano, infatti, sono presenti differenti associazioni cellulari e quindi non è apparentemente visibile la classica "onda spermatogenetica" visibile in altri mammiferi. Una volta avviata la spermatogenesi, in ogni area circoscritta di tubulo seminifero, gli spermatozoi vengono quindi rilasciati nel lume circa ogni 16 giorni, ma in aree diverse del tubulo la spermatogenesi inizia in momenti diversi e, quindi, l'intero tubulo garantisce una produzione continua di spermatozoi.

## IL PRIVILEGIO IMMUNITARIO DEL TESTICOLO

Nei mammiferi la **competenza immunologica** è acquisita nel periodo perinatale e consiste nella capacità di riconoscere tutti gli antigeni presenti fino a quel momento

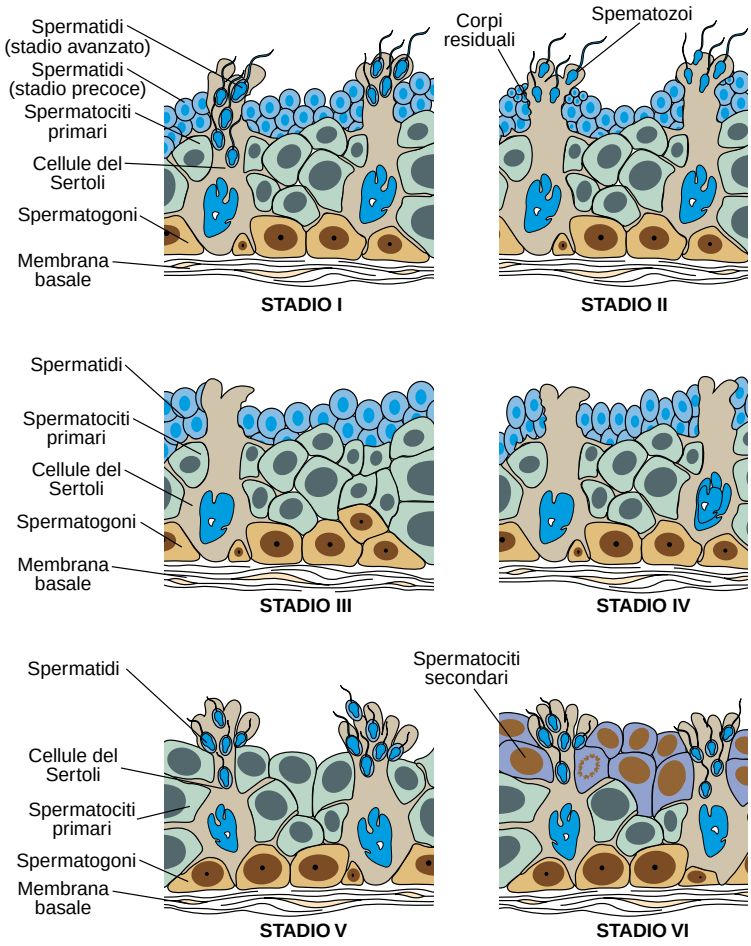



**Figura 6-13** ■ Disegno schematico che illustra le sei differenti associazioni cellulari (stadi) del ciclo dell'epitelio seminifero nell'uomo. Considerando che la durata di un ciclo è di 16 giorni e in questo periodo si succedono tutti gli stadi, il decorso temporale in percentuale di ogni associazione cellulare dallo stadio I al VI è rispettivamente del 30%, 20%, 6%, 8%, 31% e 5%.

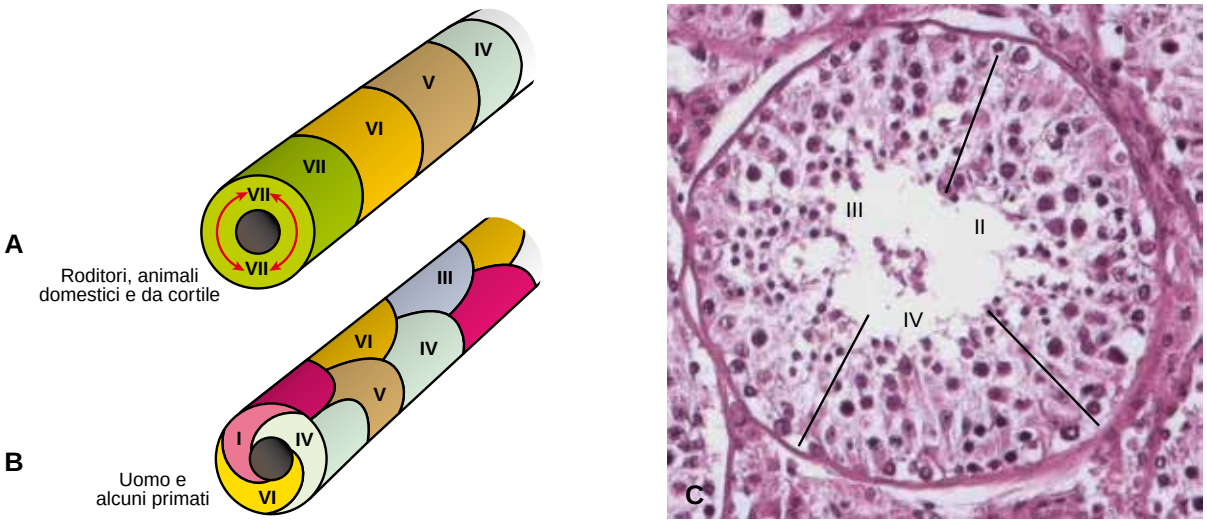



**Figura 6-14** ■ *A)* Schema di tubulo seminifero che illustra la successione ordinata spaziale (onda dell'epitelio seminifero) degli stadi del ciclo dell'epitelio seminifero tipica di differenti specie di mammiferi non primati. Le diverse associazioni cellulari, indicate dai numeri romani, si estendono per tutta la circonferenza del tubulo. *B)* Il disegno rappresenta la distribuzione dei diversi stadi del ciclo dell'epitelio seminifero umano che occupano piccole aree circoscritte di tubulo seminifero. Appare evidente come in una sezione istologica trasversale di tubulo seminifero umano sono presenti differenti associazioni cellulari. *C)* Sezione istologica trasversale di tubulo seminifero umano che mostra nella stessa sezione differenti associazioni di cellule germinali (stadi II, IV e III del ciclo dell'epitelio seminifero). (Fotografia di B. Muciaccia, Dipartimento di SAIMLAL, Sezione di Istologia ed Embriologia Medica, Sapienza Università di Roma)

come propri ("self"); mentre tutti gli antigeni che in seguito compariranno nell'organismo saranno considerati non propri ("non self") e indurranno una reazione immunitaria. Alla pubertà, quando l'organismo ha già acquisito la competenza immunitaria, ha inizio la spermatogenesi e nel corso di questo processo, le cellule germinali iniziano un nuovo programma differenziativo che, come abbiamo visto, porterà alla formazione di spermatozoi maturi. Durante questo processo, le cellule germinali esprimono nuovi antigeni di superficie che non appartengono alla famiglia del "self" e tuttavia vengono ben tollerati *in situ*. D'altra parte, se omogenati di tessuto testicolare o spermatozoi purificati autologhi fossero iniettati in altre sedi corporee dello stesso individuo da cui provengono, sarebbero in grado di indurre una grave risposta autoimmune (orchite autoimmune ottenuta in modelli sperimentali). Questa reazione immunitaria autologa, che esita in un'orchite (infiammazione del testicolo) autoimmune, si caratterizza per la presenza di infiltrazioni massive di linfociti e macrofagi nei tubuli seminiferi, nei dotti, fino ai vasi deferenti e il quadro istopatologico finale della malattia consiste nella marcata atrofia dei tubuli seminiferi con il completo blocco della spermatogenesi. In condizioni fisiologiche, il testicolo è in grado sia di tollerare la presenza di **cellule germinali autoantigeniche**, sia di accettare allotrapianti di tessuto nello spazio interstiziale senza dar luogo a fenomeni di rigetto; per tali caratteristiche il testicolo è considerato un sito **immunologicamente privilegiato**.

Gli altri distretti corporei immunologicamente privilegiati sono: la camera anteriore dell'occhio, il cervello e l'utero gravido. Il carente drenaggio linfatico che caratterizza l'occhio e il cervello sembra essere il principale responsabile di questa condizione di privilegio immunologico in tali organi; tuttavia nel testicolo il sistema linfatico è estremamente ben organizzato ed efficiente. Dunque, i meccanismi che, in normali condizioni fisiologiche, governano la tolleranza immunitaria nel testicolo e lo proteggono dall'insorgenza dell'orchite autoimmune sono complessi, e coinvolgono sistemi di controllo a livello sistemico e locale.

Il meccanismo sistemico di regolazione non è completamente definito: è noto soltanto che sicuramente sono coinvolti i linfociti T; infatti, topi privati del timo (timectomizzati) entro il quarto giorno dalla nascita si ammalano di orchite autoimmune tra le 5 e le 7 settimane d'età (periodo della pubertà). Tra i meccanismi che agiscono a livello locale, un ruolo certamente fondamentale è svolto dalla **barriera emato-testicolare** che sequestra meccanicamente gran parte degli autoantigeni delle cellule germinali nel compartimento adluminale del tubulo seminifero (inaccessibile alle cellule immunocompetenti interstiziali). In realtà, è stato osservato che a livello della rete testis e dei condottini efferenti, la barriera emato-testicolare presenta delle zone di discontinuità che permettono alcuni scambi con lo spazio interstiziale e il conseguente passaggio di proteine sieriche. Inoltre, è stata recentemente rilevata la presenza di autoantigeni testicolari sulla membrana degli spermatociti in preleptotene, localizzati al di fuori della barriera emato-testicolare e accessibili alle cellule immunocompetenti interstiziali. A dimostrazione del fatto che possano essere presenti meccanismi multipli responsabili della tolleranza immunitaria del testicolo è stata, infatti, identificata la presenza di **fattori solubili locali**, prodotti dalla cellula del Sertoli, in grado di interferire con la risposta immune linfocitaria.

Alcuni autori hanno inoltre proposto un ruolo chiave dei macrofagi e dei mastociti, dell'interstizio testicolare, nella regolazione dell'immunosoppressione locale. Più recentemente, in un modello sperimentale murino, è stato dimostrato che le cellule del Sertoli inibiscono direttamente la proliferazione dei linfociti CD8+ attraverso l'espressione (indotta dalla citochina *interferon*-γ) della molecola co-stimolatoria negativa PD-L1; nello stesso tempo, le cellule del Sertoli sono anche in grado di stimolare la proliferazione di una sottopopolazione di linfociti che riveste un ruolo fondamentale nella tolleranza immunitaria periferica, le **cellule T regolatorie** (Treg).

Il complesso e biologicamente fondamentale meccanismo che presiede al mantenimento della tolleranza immunitaria testicolare è, quindi, finemente controllato e i fattori implicati sono molteplici e certamente ridondanti. Appare chiaro come lo studio dei meccanismi patogenetici dell'orchite autoimmune, responsabile di una forma di infertilità spontanea in diverse specie di animali, possa chiarire alcune forme di infertilità maschile di natura immunitaria. A questo proposito, è importante sottolineare che reazioni infiammatorie croniche (per lo più asintomatiche) nel testicolo umano, con infiltrazione linfocitaria intratubulare, somigliano all'orchite autoimmune e sono, quindi, potenzialmente causa di sterilità conseguente a uno sconvolgimento della spermatogenesi e deterioramento del numero e della qualità degli spermatozoi. Questo quadro istopatologico, caratterizzato da infiltrazione di linfociti T attivati all'interno dei tubuli seminiferi, suggerisce una profonda alterazione dei meccanismi di immunoregolazione locale e, quindi, dell'immunoprivilegio testicolare.

## PROCESSI E MOLECOLE

### *Regolazione endocrina, paracrina e autocrina della spermatogenesi*

La spermatogenesi è un processo differenziativo complesso regolato da diversi ormoni proteici e steroidei che, insieme a numerose altre molecole, agiscono con meccanismo endocrino, paracrino e autocrino. L'inizio ed il mantenimento della spermatogenesi sono strettamente controllati dall'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo e richiedono la secrezione di due **gonadotropine**, **FSH** (follicle stimulating hormone) e **LH** (luteinizing hormone) da parte dell'adenoipofisi, in risposta al **GnRH** (gonadotropin releasing hormone) secreto a sua volta dall'ipotalamo (Fig. 6-15). L'FSH agisce sulle cellule del Sertoli, mentre l'LH agisce sulle cellule di Leydig, mediante specifici recettori presenti esclusivamente su queste cellule somatiche. Stimolando la produzione di un gran numero di molecole regolative da parte delle cellule somati-

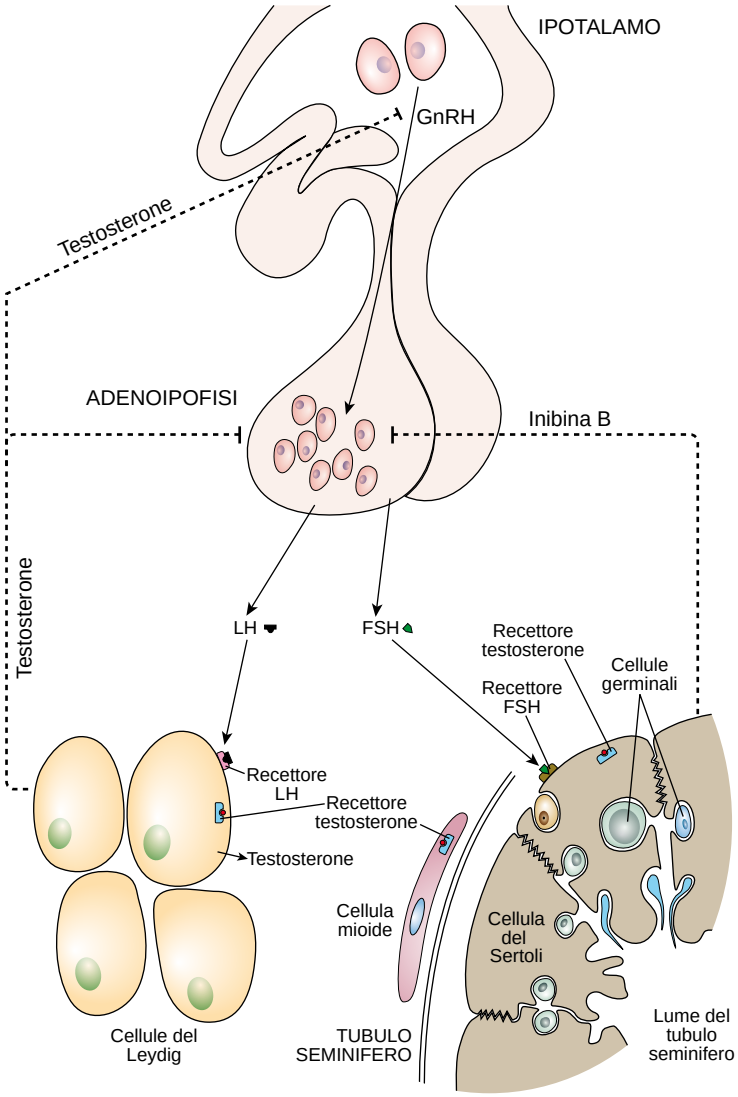



**Figura 6-15** ■ Rappresentazione schematica della regolazione endocrina della spermatogenesi. L'ipotalamo stimola la secrezione di FSH e LH da parte dell'adenoipofisi, mediante il rilascio di GnRH. L'FSH si lega ai recettori presenti sulla cellula del Sertoli che secerne diverse molecole con funzione regolatrice. Tra queste l'inibina B è responsabile di un controllo a feedback negativo sulla secrezione di FSH da parte dell'ipofisi. In risposta allo stimolo dell'LH, le cellule del Leydig secernono testosterone che: 1) controlla il differenziamento delle cellule germinali nei tubuli seminiferi stimolando le cellule del Sertoli; 2) esercita un feedback negativo sulla produzione di LH da parte dell'ipofisi e di GnRH da parte dell'ipotalamo. Le linee tratteggiate indicano inibizione della produzione di ormoni.

che, FSH e LH modulano lo sviluppo delle cellule germinali. Un ruolo primario in questo processo è svolto dal **testosterone** (T) che viene secreto dalle **cellule del Leydig** in risposta all'LH.

Ad aumentare la complessità dei meccanismi di controllo esiste un altro livello di regolazione locale della risposta delle cellule del Sertoli e del Leydig all'FSH e all'LH da parte delle stesse cellule (**autocrina**) e delle cellule vicine (**paracrina**) mediata da segnali che a loro volta agiscono in modo paracrino e autocrino sul differenziamento delle cellule germinali (Fig. 6-16).

### Ruolo dell'FSH

La secrezione di FSH da parte dell'adenoipofisi inizia intorno al terzo mese di vita fetale, aumenta nei primi mesi dopo la nascita raggiungendo un picco a 4-5 mesi, poi gradualmente diminuisce, mantenendosi a livelli bassi fino al momento della pubertà quando l'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo viene riattivato. Si ritiene che l'FSH sia essenziale alla pubertà per dar inizio alla produzione di spermatozoi. Tuttavia mutazioni e/o inattivazione dell'FSH o del suo recettore, pur inducendo una drammatica riduzione del numero degli spermatozoi nonché

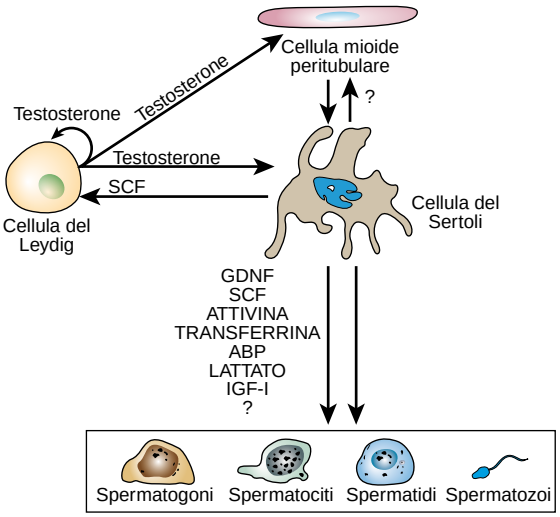



**Figura 6-16** ■ Schema che illustra la modalità di regolazione paracrina e autocrina della spermatogenesi ad opera di diverse molecole prodotte localmente e coinvolte nell'interazione tra i seguenti tipi di cellule testicolari: cellule del Leydig, cellule del Sertoli, cellule mioidi e cellule germinali. Il testosterone prodotto dalla cellula del Leydig, oltre ad agire con meccanismo endocrino e autocrino, ha un ruolo essenziale nella stimolazione della spermatogenesi mediato dalla cellula del Sertoli. Notare che il testosterone non agisce direttamente sulle cellule germinali. Nello schema sono indicati i principali fattori di crescita (GDNF, SCF, IGF-1) e altre molecole (attivina, transferrina, ABP, lattato) prodotte e secrete dalla cellula del Sertoli.

un'alterazione della loro morfologia, non causano sterilità, suggerendo che l'FSH permette lo svolgimento di una spermatogenesi quantitativamente normale (vedi paragrafo "Aspetti clinici").

Le sole cellule del testicolo che presentano i recettori per l'FSH sono le cellule del Sertoli**.** All'interno dei tubuli seminiferi esse formano le nicchie dove si differenziano le cellule germinali, provvedendo a dare un sostegno strutturale (vedi sezione precedente), ma anche limitando la quantità di spermatozoi prodotti dal testicolo. Infatti studi su modelli animali e sull'uomo hanno dimostrato che ciascuna cellula del Sertoli è capace di prendere contatto, fisicamente, con un numero limitato di cellule germinali e che di conseguenza esiste una stretta relazione tra il numero di gameti rilasciati e il numero di cellule del Sertoli presenti nel testicolo. Da ciò deriva l'importanza della regolazione del processo di **proliferazione** delle **cellule del Sertoli** che avviene prima della pubertà durante un periodo compreso tra poco prima della nascita e il primo periodo di vita postnatale, sotto il controllo determinante dell'FSH.

Oltre alla proliferazione delle cellule del Sertoli, l'FSH regola la secrezione da parte di queste cellule di molecole che influenzano la sopravvivenza e il destino delle cellule germinali. Tra queste, **GDNF** (glial derived neurotrophic factor) è un fattore di crescita che svolge un ruolo cruciale nella proliferazione degli spermatogoni staminali, sia umani che murini, mantenendone le proprietà staminali e inibendone il differenziamento (vedi più avanti).

Un altro fattore di crescita prodotto dalle cellule del Sertoli in risposta all'FSH è **SCF** (stem cell factor) che ha un ampio spettro di azione poiché il suo recettore **Kit** è espresso in diversi tipi di cellule testicolari. La maggior parte delle conoscenze sulla funzione del complesso SCF/Kit derivano dai topi knockout per il ligando o il recettore che mostrano lo stesso fenotipo caratterizzato da diverse alterazioni della spermatogenesi sia nella fase fetale che postnatale. Dall'analisi di questi animali sappiamo che: a) SCF induce la migrazione e sostiene la sopravvivenza delle cellule germinali primordiali durante lo sviluppo della gonade indifferente; b) SCF funziona come un importante fattore di sopravvivenza degli spermatogoni, tranne quelli staminali, che non esprimono Kit; c) SCF svolge un ruolo importante nel differenziamento e nella sopravvivenza.delle cellule di Leydig. Inoltre difetti dell'espressione di SCF/Kit sono stati osservati in diverse disfunzioni testicolari nell'uomo.

Le cellule del Sertoli, in risposta all'FSH, secernono molti fattori importanti per il metabolismo delle cellule germinali, quali la **transferrina**, per il trasporto del ferro, il **lattato** come metabolita energetico, l'**ABP** (androgen binding protein) per concentrare gli androgeni (vedi più avanti).

Di grande rilevanza clinica è l'**inibina B**, un fattore di crescita della famiglia del TGF-β, prodotto solo dal testicolo e prevalentemente dalle cellule del Sertoli sotto il controllo primario dell'FSH. L'azione biologica di questa proteina è l'inibizione della secrezione dell'FSH da parte dell'ipofisi con un meccanismo di feedback negativo, mentre mancano al momento evidenze cliniche circa una sua azione intratesticolare. I livelli di inibina B nel siero correlano con il volume testicolare e il numero degli spermatozoi. Riflettendo quindi lo stato funzionale dell'epitelio seminifero, l'inibina B rappresenta un parametro endocrino molto utile, poco invasivo, nella diagnosi di condizioni patologiche testicolari. Studi nel ratto hanno dimostrato un ruolo paracrino/autocrino dell'**attivina**, un altro fattore di crescita della famiglia del TGF-β, che stimola la proliferazione FSH dipendente delle cellule del Sertoli e inibisce il differenziamento degli spermatogoni durante la fase iniziale di crescita del testicolo, suggerendo l'importanza di questi fattori nella regolazione dell'FSH nel periodo prepuberale.

Un altro marcatore della funzionalità testicolare è l'ormone **AMH** (anti-Müllerian hormone), secreto dalle cellule del Sertoli nel periodo prenatale quando è responsabile della regressione dei dotti di Müller (vedi Capitolo 16). La sua produzione, tuttavia, non termina nel periodo fetale, ma continua fino all'età adulta, a livelli più bassi a cominciare dalla pubertà, sotto lo stimolo dell'FSH. Studi clinici hanno dimostrato la sua importanza nella diagnosi di disfunzioni testicolari.

L'FSH, insieme al testosterone, modula un peculiare destino a cui possono andare incontro le cellule germinali: la morte per apoptosi. Il significato fisiologico dell'**apoptosi spontanea** delle cellule germinali che ha luogo durante la spermatogenesi è quello di limitare il

numero delle cellule germinali e far sì che le cellule del Sertoli siano in grado di svolgere l'azione di supporto meccanico per esse. Nel testicolo umano l'apoptosi colpisce tutti i tipi di cellule germinali, spermatogoni, spermatociti, spermatidi e spermatozoi, con diversi meccanismi. È stato già menzionato il fattore SCF, rilasciato dalla Sertoli in risposta all'FSH, che agisce in modo paracrino prevenendo la morte degli spermatogoni che esprimono kit. Il sistema **Fas/ligando di Fas** è un altro meccanismo di regolazione della sopravvivenza cellulare attivo nel testicolo. È stato descritto, infatti, che il recettore Fas è presente sulla membrana plasmatica di circa il 50% di spermatozoi eiaculati e il fatto che gli spermatozoi umani normali, ma non quelli atipici, presentano il ligando di Fas sulla loro superficie suggerisce che questo sistema possa agire nel controllare la qualità del seme, eliminando i gameti anormali.

Studi su modelli sperimentali di roditori di soppressione dell'FSH mediante trattamento con un anticorpo specifico neutralizzante hanno consentito di chiarire che: a) la gonadotropina esercita un effetto anti-apoptotico in sinergia con il T sulla sopravvivenza delle cellule germinali, in particolare gli spermatogoni; b) l'FSH ha un effetto diretto, indipendente dal T, sulla progressione da spermatogonio A a quello B.

### Ruolo dell'LH

L'andamento della secrezione dell'LH da parte dell'adenoipofisi durante lo sviluppo è molto simile a quello dell'FSH, con un aumento significativo alla pubertà. La funzione essenziale dell'LH nel testicolo adulto è la regolazione della sintesi e del rilascio di **testosterone** da parte delle cellule del Leydig. È di particolare interesse che l'inattivazione del gene dell'LH o di quello del suo recettore porta all'arresto della spermatogenesi nel topo. Tuttavia il trattamento di questi animali con il testosterone fa sì che il processo differenziativo riprenda e giunga a termine, dimostrando chiaramente che il solo testosterone è sufficiente a mantenere la spermatogenesi. Un'ulteriore evidenza della rilevanza del T deriva da esperimenti in cui l'eliminazione delle cellule del Leydig mediante una specifica sostanza tossica ha come conseguenza un arresto della spermatogenesi che può tuttavia essere completamente ripristinata dal trattamento con il solo testosterone, confermando il concetto che non sono necessari altri fattori, se non quelli regolati dal T, prodotti dalle cellule del Leydig per permettere lo sviluppo delle cellule spermatogeniche.

### Ruolo del testosterone

La secrezione di testosterone (T) dalle cellule del Leydig inizia all'ottava settimana di sviluppo embrionale sotto il controllo dell'hCG e aumenta raggiungendo un picco tra la 11ª e 17ª settimana, contribuendo al differenziamento sessuale delle gonadi e delle vie genitali in senso maschile (vedi Capitolo 16). Durante la dodicesima settimana inizia la secrezione delle gonadotropine da parte dell'ipofisi e nella seconda metà di vita fetale si instaura il feedback negativo da parte del T sulla secrezione di a) LH dall'ipofisi, b) GnRH dall'ipotalamo e c) T dalle stesse cellule di Leydig.

È di particolare interesse che la concentrazione di T nel testicolo è 100 volte superiore a quella nel siero, anche se non è chiara la rilevanza fisiologica di un ambiente con livelli di T così alti per una normale spermatogenesi. Il testosterone agisce tramite il **recettore AR** (androgen receptor) che è presente nel testicolo in diversi tipi cellulari, quali le cellule del Sertoli, le cellule mioidi e le stesse cellule del Leydig, ma non le cellule germinali. Da ciò deriva che l'effetto determinante del T sulla maturazione delle cellule spermatogeniche nei tubuli seminiferi è mediato dalle cellule del Sertoli. Ad oggi sono stati identificati pochi geni che sono espressi nelle cellule del Sertoli in seguito all'attivazione del recettore degli androgeni, e per nessuno di questi è stato ancora definito un ruolo regolativo nella spermatogenesi. Tuttavia l'inattivazione specifica di AR nelle cellule del Sertoli di topo ha consentito di identificare le fasi della spermatogenesi che sono sotto il controllo essenziale degli androgeni: a) il differenziamento degli spermatociti primari dopo la profase della prima divisione meiotica; b) la transizione da spermatidi rotondi a spermatidi allungati; c) la spermiazione. Ci sono evidenze che quando i livelli testicolari di T sono soppressi si verifica un prematuro distacco degli spermatidi rotondi dalle cellule del Sertoli, suggerendo il coinvolgimento di meccanismi di adesione tra queste cellule e le cellule germinali che sono controllati in modo sinergico anche dall'FSH. Come già detto sopra, l'azione combinata di T e FSH esercita un effetto benefico che previene l'apoptosi degli spermatogoni. Al contrario, il T, in modo indipendente dall'FSH, è capace di mantenere la produzione di gameti e quindi la fertilità.

A seconda della dose somministrata e della durata del trattamento, il T può esercitare un effetto inibitorio sulla spermatogenesi causando la soppressione della secrezione di FSH e LH. Questa condizione causa un depletamento graduale di cellule germinali nel testicolo fino all'insorgenza di azoospermia (assenza di spermatozoi nel seme) o di una grave oligozoospermia (riduzione del numero degli spermatozoi) (vedi paragrafo "Aspetti clinici: contraccezione maschile").

Il **diidrotestosterone** (DHT) deriva dalla conversione del T ad opera dell'enzima 5 α-reduttasi. Il DHT ha un ruolo primario nel differenziamento dei genitali esterni. Questi infatti non si sviluppano in caso di un difetto genetico dell'enzima 5 α-reduttasi di tipo 2 che converte T in DHT, pur in presenza di livelli normali di T (sindrome di deficienza della 5 α-reduttasi) (vedi Capitolo 16).

Un uomo nella sua piena maturità sessuale, oltre a T e DHT, produce minori quantità di ormoni androgeni più deboli, androstenedione e il diidroepiandrosterone.

### Ruolo degli estrogeni

Gli estrogeni derivano dagli androgeni circolanti attraverso l'aromatizzazione, una modificazione chimica ca-

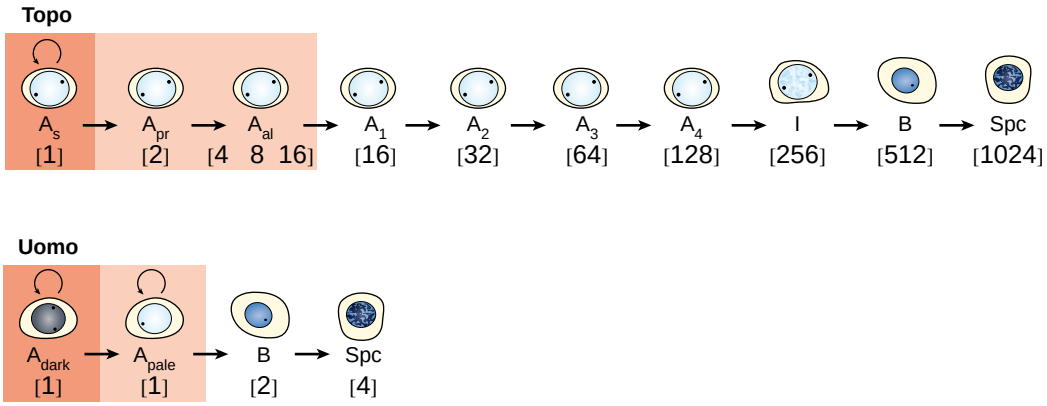



**Figura 6-17** ■ Confronto tra il compartimento degli spermatogoni del topo e dell'uomo. Nel topo sono stati identificati 9 tipi di spermatogoni: da uno spermatogonio staminale As attraverso otto divisioni mitotiche si formano 128 A4, da questi dopo due ulteriori divisioni (spermatogoni I =intermedi e spermatogoni B) si formano 1024 spermatociti primari che iniziano la meiosi. Nell'uomo, sono stati identificati solamente tre tipi di spermatogoni (Ad, Ap e B) che vanno incontro a un più limitato numero di divisioni mitotiche. Tra parentesi, i numeri delle cellule che si formano a partire da un singolo spermatogonio staminale As (topo) e Ad (uomo).

talizzata dall'enzima aromatasi. L'azione degli estrogeni è mediata dal legame con due specifici recettori nucleari, ERα e ERβ. Nel testicolo umano sia l'aromatasi che i recettori sono espressi nelle cellule di Leydig, nelle cellule del Sertoli e nelle cellule germinali compresi gli spermatozoi eiaculati, indicando che gli estrogeni sono prodotti localmente nella gonade e le cellule testicolari sono in grado di rispondere ad essi. Dai dati ottenuti nei topi knockout (in cui i geni che codificano per ER non sono funzionali) si ritiene che il recettore ER alfa sia indispensabile al mantenimento di una normale fertilità maschile. È stato inoltre dimostrato nell'uomo un effetto soppressivo degli estrogeni sulla secrezione delle gonadotropine a livello ipofisario e del GnRH a livello ipotalamico.

## *Il compartimento degli spermatogoni e lo sviluppo delle ricerche sugli spermatogoni staminali*

La produzione di spermatozoi dipende dalla continua attività degli spermatogoni staminali (spermatogonial stem cells, **SSCs**) che rappresentano una sottopopolazione quantitativamente molto piccola delle cellule germinali maschili. Nell'uomo gli spermatogoni staminali corrisponderebbero agli **Ad** o una loro sottopopolazione. Come già detto sopra, il loro ruolo cruciale è: 1) di autorinnovarsi, per mantenere la riserva di cellule staminali, e 2) di dare origine a cellule progenitrici (spermatogoni, **Ap**) che possono differenziare in spermatozoi. I meccanismi che regolano questi due destini degli SSC sono ancora poco conosciuti. Di fatto gli SSC sarebbero cellule relativamente quiescenti che servirebbero a rinnovare periodicamente gli spermatogoni Ap. Gli SSC, come tutte le cellule staminali adulte (vedi Capitolo 4) vivono in un microambiente particolare chiamato **nicchia** dove, grazie ad interazioni molecolari con cellule vicine e con molecole della matrice circostante, possono mantenere le loro caratteristiche. Solo uscendo dalla nicchia, essi differenziano in Ap (Fig. 6-17).

Poiché il numero degli SSC è molto piccolo (nel topo si stima che essi rappresentino circa lo 0,03% delle cellule germinali totali) e al momento non si conoscono marcatori molecolari che permettano di riconoscerli con certezza, è molto difficile studiare le loro proprietà biologiche e i meccanismi molecolari che ne controllano il rinnovamento e il differenziamento. Un avanzamento fondamentale nella comprensione della biologia degli SSC è stato possibile grazie agli studi di Ralph Brinster che nel 1994 hanno dimostrato nel topo la possibilità di trapiantare una popolazione eterogenea di cellule germinali maschili in testicoli privi di cellule germinali di un animale ricevente e ottenere differenziamento fino a spermatozoi funzionali. Tale strategia rappresenta al momento il saggio funzionale per l'identificazione degli SSC negli studi di caratterizzazione del fenotipo molecolare di questo tipo di cellule. Nel 2003 è stato messo a punto un protocollo per coltivare ed espandere in vitro gli SSC di topo. Queste cellule possono essere mantenute *in vitro* proliferanti per periodi molto lunghi (fino a due anni), purché in presenza di siero e/o monostrato cellulare e una combinazione di fattori di crescita. Tra questi il **GDNF** (glial cell line-derived neurotrophic factor), che è secreto dalle cellule del Sertoli in risposta all'FSH (vedi sopra), ha un ruolo primario nel processo di **autorinnovamento** e consente agli SSC di mantenere la proprietà di autorinnovarsi e di dare origine a spermatogenesi normale dopo il trapianto in animali sterili. In questo contesto, è di grande interesse la straordinaria scoperta che gli SSC, isolati da topi immaturi e/o adulti e coltivati in vitro, possono generare, anche se con una bassa frequenza, cellule simili alle cellule embrionali

staminali (embryonic stem cells, ESC, vedi Capitolo 4), con le stesse pluripotenzialità differenziative. Questo risultato sperimentale ha suscitato grande attenzione, dando una forte spinta alla ricerca di proprietà simili anche negli spermatogoni staminali di uomo. I risultati finora raggiunti dimostrano che è possibile coltivare ed espandere in vitro spermatogoni staminali ottenuti da biopsie di testicoli umani sia di pazienti prepuberi che adulti e che durante la coltura in vitro di queste cellule in opportune condizioni compaiono cellule simili alle ESC. Tuttavia, al contrario di quanto accade nel topo, tali cellule non sono pluripotenti, bensì sono in grado di differenziare solamente in cellule di natura mesenchimale, quali fibroblasti, adipociti, condrociti, osteociti. Sono in corso numerose e ulteriori ricerche per confermare e ampliare le conoscenze in questo campo che riveste particolare interesse in vista di una possibile applicazione degli spermatogoni staminali nella terapia della fertilità di pazienti oncologici in età pediatrica e nella terapia cellulare autologa nell'ambito della medicina rigenerativa, anche se limitata ai maschi.

## *Epididimo e maturazione degli spermatozoi*

Il canale dell'**epididimo**, come abbiamo già visto, è un unico condotto estremamente convoluto, lungo circa 5-6 metri e diviso in tre regioni: testa, corpo e coda. È completamente immerso in uno stroma di tessuto connettivo lasso di sostegno, costituito da fibroblasti, matrice amorfa, fibre collagene e vasi sanguigni, e circondato da una capsula connettivale fibrosa compatta. L'epitelio del dotto epididimale è un **epitelio colonnare pseudostratificato** composto da almeno tre differenti tipi di cellule: **cellule basali**, **cellule principali** e **cellule chiare** (sulla cui superficie, ad eccezione delle cellule basali, sono presenti lunghi e atipici microvilli impropriamente denominati **stereociglia)**. Ogni tipo cellulare, di concerto con le altre cellule, contribuisce alla stabilizzazione ed alla regolazione di uno speciale microambiente del lume epididimale per il deposito, maturazione e vitalità degli spermatozoi. Il tempo di transito che uno spermatozoo impiega per attraversare tutto l'epididimo umano è relativamente rapido ed è di 2-6 giorni. Alcuni studi funzionali, effettuati su spermatozoi prelevati dalle diverse regioni dell'epididimo umano, hanno chiaramente dimostrato che le cellule, durante il transito epididimale, vanno incontro ad un processo di maturazione, acquisendo una progressiva motilità e la capacità di fecondare un'ovocita. L'estrema importanza della funzione dell'epididimo nella maturazione degli spermatozoi è enfatizzata dal fatto che difetti della motilità e scarsa capacità adesiva con l'ovocita sono tra le possibili cause di infertilità. La maturazione degli spermatozoi dipende dalla creazione di uno specifico **microambiente luminale** all'interno del canale dell'epididimo. Questo complesso microambiente epididimale è condizionato dalle differenti proteine prodotte e secrete dalle cellule epiteliali nonché dalle alte concentrazioni di ioni inorganici e piccole molecole organiche che creano un microambiente iperosmotico rispetto al siero. Oltre a questa notevole funzione secernente, l'epitelio epididimale è responsabile anche di una grande attività di riassorbimento di fluido epididimale che porta ad un'alta concentrazione di spermatozoi e molecole luminali. La funzione delle cellule epididimali è fortemente dipendente dagli androgeni e principalmente dal diidrotestosterone. La peculiare e specifica composizione molecolare del microambiente luminale è garantita e regolata dalla **barriera emato-epididimale**, la cui base morfologica è rappresentata dalle giunzioni occludenti che si trovano nei dispositivi di giunzione presenti tra le cellule epiteliali dell'epididimo. L'espressione delle proteine transmembrana delle giunzioni come occludina e claudina è dipendente dagli androgeni. La barriera emato-epididimale costituisce, inoltre, una barriera immunologica nell'epididimo, la cui funzione è quella di proteggere gli spermatozoi autoantigenici presenti nel lume epididimale dall'attacco del sistema immunitario. A questo proposito, risulta particolarmente interessante che alterazioni funzionali delle giunzioni cellulari nell'epitelio epididimale umano si associano ad infertilità.

Diverse evidenze sperimentali hanno dimostrato che nel fluido epididimale sono presenti una grande quantità di fattori (tra i quali, per esempio, androgeni, bFGF, oxysteroli, angiotensina II e molte altre molecole) che regolano la funzione delle cellule epiteliali dell'epididimo e che nel complesso sono responsabili della maturazione degli spermatozoi. Un'importante caratteristica biologica che regola la maturazione degli spermatozoi è costituita dall'acidificazione del fluido luminale da parte delle cellule epiteliali dell'epididimo. È noto, infatti, che una bassa concentrazione di bicarbonato ($HCO_3^-$) e un basso pH sono essenziali al mantenimento di uno stato inattivo e latente degli spermatozoi epididimali. Alcuni inquinanti ambientali come il fumo di tabacco oltre a diversi metalli pesanti, inibendo l'acidificazione del fluido luminale, sono responsabili di una riduzione della fertilità maschile.

L'acidificazione del fluido epididimale viene realizzata dalle cellule epiteliali e, in particolare, dalle cellule chiare. Le cellule chiare sono infatti coinvolte nella secrezione di protoni ad opera della pompa protonica ATPasi (**V-ATPase**) che è espressa ad alti livelli nella loro membrana plasmatica apicale. È stata descritta una rete di comunicazioni intercellulari tra le cellule dell'epitelio epididimale che regola la secrezione protonica dipendente dalla V-ATPase delle cellule chiare. In sintesi, l'influenza delle cellule principali sulla secrezione protonica della V-ATPase delle cellule chiare, attraverso la secrezione nel lume di bicarbonato e ATP, costituisce il meccanismo ormone-indipendente di acidificazione del fluido epididimale (Fig. 6-18). L'interazione funzionale tra cellule chiare e cellule basali, attraverso componenti del sistema renina-angiotensina, è stata recentemente indicata come un ulteriore meccanismo fondamentale per garantire l'acidificazione del fluido nel lume epididimale (vedi Fig. 6-18 per una descrizione dettagliata). L'**angiotensina II** (ANGII) è prodotta dall'ANGI per azione dell'enzima *angiotensin* I-*converting enzyme* (ACE) che esiste anche nella forma testicolare (**tACE**) ol-

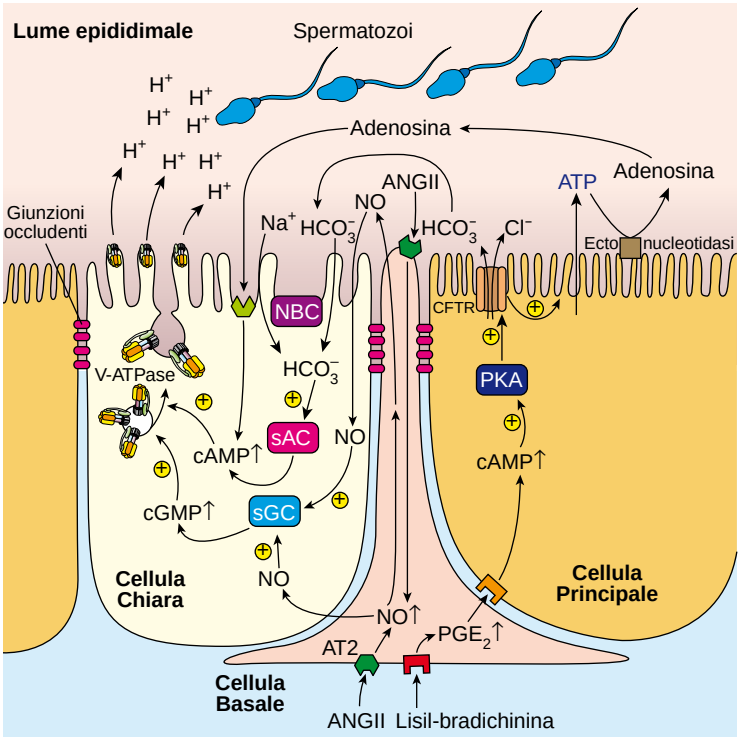



**Figura 6-18** ■ Rappresentazione schematica della comunicazione intercellulare nell'epitelio epididimale. *Interazione cellule principali-cellule chiare*: una stimolazione basolaterale, attraverso la lisil-bradichinina e la prostaglandina E2 (PGE2), induce la secrezione di bicarbonato ($HCO_3^-$) e di cloro ($Cl^-$) da parte delle cellule principali. La conseguente attivazione dell'adenilato ciclasi bicarbonato-sensibile (sAC) e dei recettori purinergici, sensibili all'adenosina, nelle cellule chiare induce un aumento di cAMP che innesca l'accumulo della pompa protonica V-ATPasi nei microvilli apicali e quindi secrezione di protoni. *Interazione cellule basali-cellule chiare*: le cellule basali riconoscono l'angiotensina II (ANGII) attraverso il recettore di tipo II, AT2, che induce a sua volta la produzione di ossido nitrico (NO) che diffonde nelle cellule chiare causando un aumento di cGMP attraverso l'attivazione della guanilato ciclasi (sGC). Il cGMP scatena quindi l'accumulo apicale di V-ATPasi e aumento della secrezione protonica nel lume dell'epididimo. PKA, proteina chinasi A; NBC, cotrasportatore del sodio bicarbonato; CFTR, canale del cloro (Cistic Fibrosis Transmembrane Regulator).

tre a quella somatica. È interessante sottolineare che animali maschi privi di tACE, pur avendo un numero normale di spermatozoi, sono infertili a causa di difetti funzionali dello spermatozoo.

Come è stato già sottolineato, molti casi di infertilità idiopatica sono correlati alla presenza nel liquido seminale di spermatozoi funzionalmente alterati, nonostante il numero e la morfologia rientrino nei valori normali. Risulta quindi particolarmente importante l'individuazione di nuovi strumenti diagnostici e terapeutici nel trattamento dell'infertilità maschile riferita a patologie post-testicolari.

## ASPETTI CLINICI

### *Infertilità maschile*

L'infertilità viene generalmente definita come l'incapacità di ottenere una gravidanza dopo un anno di rapporti sessuali regolari che non ricorrono ad alcun metodo contraccettivo. È stato stimato che in molti paesi industrializzati vi sia una diminuzione della fertilità di coppia e che circa il 15% delle coppie sia infertile. L'incidenza del fenomeno è in graduale aumento e ad esso contribuiscono numerosi fattori tra cui l'innalzamento dell'età media in cui si ricerca la gravidanza, lo stress, la maggiore esposizione a fattori ambientali nocivi. L'infertilità di coppia è legata al fattore femminile per circa il 35% dei casi e al fattore maschile per il 30%; nel 20% dei casi si rivelano anomalie riproduttive in ambedue i partners mentre nel 15% dei casi la causa eziologica dell'infertilità rimane sconosciuta (infertilità idiopatica).

Un primo inquadramento dell'infertilità maschile si basa sull'esame del liquido seminale che comprende la valutazione delle caratteristiche degli spermatozoi (spermiocitogramma) e del plasma seminale. Le alterazioni quantitative e qualitative del liquido seminale sono riportate in Tabella 6-1.

In presenza di anomalie del liquido seminale, numerosi fattori eziologici possono determinare situazioni di infertilità transitorie o definitive. Tra le principali cause, segnaliamo:

- cause genetiche (microdelezioni del cromosoma Y, sindrome di Klinefelter) (Fig. 6-19);
- cause congenite (criptorchidismo, anorchia, agenesia dei dotti deferenti, ostruzione delle vie genitali);
- cause endocrine (deficit di gonadotropine, eccesso di estrogeni, eccesso di androgeni);
- cause infettive (infezioni delle ghiandole accessorie, parotite – orecchioni –, sifilide);
- cause vascolari (varicocele).

**Microdelezioni del cromosoma Y.** Queste rappresentano attualmente, insieme alle anomalie cromosomiche, la più frequente e meglio caratterizzata causa genetica di infertilità maschile. La regione del cromosoma Y rilevante per la spermatogenesi è denominata AZF (fattore dell'azoospermia), si trova sul braccio lungo dell'Y ed è stata ulteriormente suddivisa in tre sub-regioni, AZFa, AZFb, AZFc, associate a quadri diversi di difetti della spermatogenesi. Le microdelezioni sono evidenziabili

**TABELLA 6-1**
Anomalie del numero, della morfologia e della motilità degli spermatozoi

| | |
|---|---|
| Normozoospermia | Normale concentrazione, motilità e morfologia degli spermatozoi (secondo il manuale dell'Organizzazione Mondiale della Sanità) |
| Oligozoospermia | Riduzione della concentrazione degli spermatozoi (<20 × 106) |
| Astenozoospermia | Alterazione quantitativa della percentuale di spermatozoi mobili (<50% di spermatozoi con motilità progressiva rapida e lenta) |
| Teratozoospermia | Aumentata percentuale di atipie della morfologia spermatica (<30% di spermatozoi con morfologia normale) |
| Oligo-astenoteratozoospermia | Anomalie di tutte e tre le variabili |
| Azoospermia | Assenza di spermatozoi nell'eiaculato |
| Aspermia | Assenza di eiaculato |

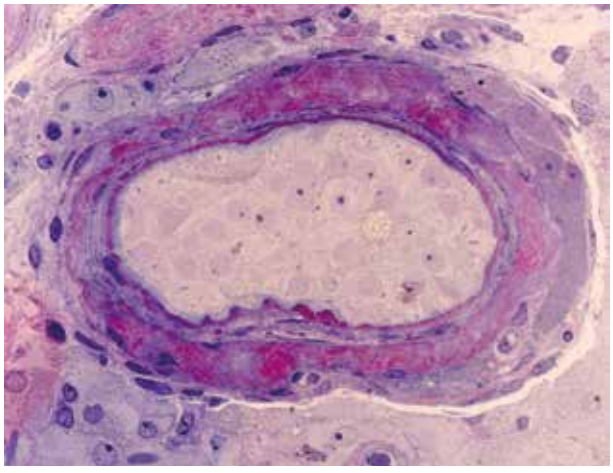


**FIGURA 6-19** ■ Fotografia al microscopio ottico di una sezione semifina da biopsia testicolare di paziente con sindrome di Klinefelter. È mostrato un tubulo privo di lume contenente solo cellule del Sertoli che hanno perso la polarità funzionale. È evidente l'ispessimento peritubulare della lamina propria dovuto a depositi di materiale ialino e fibre collagene. Nel compartimento interstiziale vi è iperplasia delle cellule del Leydig che appaiono disposte in maniera epitelioide. Colorazione con AzurB-fucsina basica. (Fotografia di R. Heyn, Dipartimento di SAIMLAL, Sezione di Anatomia Umana, Sapienza Università di Roma)

con l'analisi molecolare e rivestono un'importanza sempre più crescente nella diagnostica del maschio infertile. Le delezioni della regione AZFa sono associate a sindrome a sole cellule del Sertoli (SCOS) con assenza di spermatozoi anche nel tessuto testicolare, quelle dell'AZFb alla sindrome dell'arresto della spermatogenesi (SGA), mentre quelle dell'AZFc sono le più frequenti e sono correlate ai quadri istopatologici più vari.

**Varicocele.** Si tratta della dilatazione varicosa delle vene che circondano i testicoli. Questa condizione induce un aumento della temperatura del testicolo ed un'ipossia cronica che causano danni morfofunzionali. Nei casi più gravi si osserva ipotrofia testicolare e un quadro seminale caratterizzato da **o**ligozoospermia, **a**stenozoospermia e **t**eratozoospermia (sindrome OAT).

**Ipogonadismo.** Si parla di ipogonadismo (minore funzionamento della gonade maschile) quando vengono prodotti bassi livelli di testosterone (<10 nM) dalle cellule di Leydig. Quando questa condizione è associata a un deficit di rilascio di gonadotropine FSH e LH, si parla di ipogonadismo ipogonadotropo, mentre quando i livelli di gonadotropine sono normali si parla di ipogonadismo ipergonadotropo.

**La sindrome di Kallmann.** Su base genetica, è caratterizzata da ipogonadismo ipogonadotropo associato ad anosmia (assenza di olfatto). Il difetto risiede nella mancata secrezione del GnRH dovuto alla compromissione del processo di migrazione dei neuroni secernenti GnRH che insieme ai neuroni olfattivi durante l'embriogenesi vanno a localizzarsi nell'ipotalamo. I pazienti presentano pubertà ritardata e infertilità come conseguenza del deficit delle gonadotropine ipofisarie.

## *Terapia dell'infertilità maschile*

La terapia dell'infertilità maschile può essere diretta alla correzione della causa che ha determinato l'alterazione del liquido seminale. Nei casi di deficit gonadotropo (ipogonadismo ipogonadotropo) (vedi sopra) si utilizza il trattamento ormonale che si basa sulla somministrazione dell'FSH, in associazione con LH o testosterone, che stimolano la spermatogenesi, inducendo la popolazione spermatogoniale e migliorando la concentrazione degli spermatozoi nell'eiaculato.

Nei casi di infertilità derivanti da infezioni alle vie genitali, la terapia antibiotica e quella antinfiammatoria possono risolvere il danno alla spermatogenesi.

In caso di varicocele, la terapia chirurgica può essere efficace per favorire la ripresa di un'attiva spermatogenesi, tuttavia non sempre l'intervento è in grado di migliorare significativamente il liquido seminale del paziente.

In seguito agli enormi progressi fatti nel campo delle tecniche di fecondazione assistita, sempre più spesso si ritiene inutile la ricerca della causa eziologica di un'azoo- o oligozoospermia e si ricorre direttamente alla tecnica **FIVET** (fecondazione in vitro con trasferimento dell'embrione) o ancor più all'**ICSI** (iniezione intracitoplasmatica del singolo spermatozoo nell'ovocito), tecnica sofisticata e a costi elevati, associata eventualmente all'estrazione di spermatozoi testicolari (TESE) (vedi paragrafo "Aspetti clinici" del Capitolo 8). Anche per l'infertilità maschile dovrebbe essere applicato un approccio diagnostico logico e sequenziale, come per le altre condizioni patologiche. Considerando l'alta incidenza di anomalie genetiche presenti nei pazienti infertili, la diagnosi di tali anomalie è di fondamentale importanza per via della loro potenziale trasmissione alla prole.

## Contraccezione maschile

La continua ricerca di metodi anticoncezionali rappresenta certamente una priorità nazionale dettata da pressanti esigenze demografiche di alcune nazioni, quali Cina e India. Nel campo della contraccezione maschile sono attualmente disponibili due metodi che tuttavia presentano importanti limiti. Infatti la vasectomia (taglio e legatura dei dotti deferenti), anche se molto efficace, non è tuttavia facilmente reversibile, e i preservativi rappresentano un metodo poco sicuro e poco gradito. L'interesse attuale è rivolto alla promettente strategia ormonale ("il pillolo") che consiste nella soppressione della secrezione delle gonadotropine che porta alla riduzione dei livelli di T intratesticolari. Questi a loro volta portano alla soppressione della spermatogenesi fino ad ottenere un'azoospermia, o grave oligozoospermia, reversibili alla sospensione del trattamento. Finora studi clinici hanno valutato l'efficacia della somministrazione combinata di testosterone e di un progestinico con risultati molto incoraggianti, anche se ancora non definitivi.

## Tumori testicolari

I tumori del testicolo rappresentano circa l'1% delle neoplasie maligne e il 4-6% di quelle che colpiscono l'apparato urogenitale maschile. Essi rappresentano la forma più comune di cancro nei maschi di età compresa tra 15 e 35 anni. In base all'origine cellulare, i tumori testicolari si classificano in **tumori germinali** (GCT, germ cell tumors) (95%) che originano da cellule germinali e **tumori non germinali** (5%) che originano dalle cellule di Sertoli, dalle cellule interstiziali o dal tessuto testicolare stromale. I tumori non germinali sono prevalentemente benigni. Tra i fattori di rischio per i tumori germinali sono state identificate numerose condizioni patologiche che comprendono anomalie dello sviluppo testicolare prenatale, quali il criptorchidismo e la sindrome da disgenesia testicolare, anomalie del liquido seminale associate a infertilità, anomalie cromosomiche, quali sindrome di Klinefelter e sindrome di Down. Altre condizioni che possono influenzare lo sviluppo di tumori germinali sono la predisposizione familiare a questo tipo di tumori e l'esposizione a interferenti endocrini, particolarmente *in utero* (vedi Capitolo 16).

Sulla base di caratteristiche istologiche e cliniche, i tumori germinali sono classificati in due gruppi: **seminomi** e **non-seminomi** (Fig. 6-20). I seminomi rappresentano circa il 50% dei tumori germinali con un'età media dei pazienti di 35 anni al momento della diagnosi. I non seminomi si sviluppano in età più giovane (circa 25 anni) e rappresentano il 40% dei tumori. Gli altri tumori germinali sono definiti misti e contengono componenti dei seminomi e non seminomi e compaiono a un'età intermedia. Tra i seminomi il sottotipo più comune (85%) è il **seminoma tipico**, caratterizzato da sottili setti fibrosi percorsi da vasi sanguigni, cellule con abbondante citoplasma, e un infiltrato di linfociti (Fig. 6-21). Tra i non seminomi, il **coriocarcinoma** è il più aggressivo, a rapida progressione e tende a metastatizzare. Con l'eccezione del **seminoma spermatocitico**, che origina probabilmente da cellule germinali che stanno per iniziare la meiosi (spermatogonio spermatocito primario), è solitamente benigno e si presenta solo in età adulta (>50 anni), tutti i tumori germinali originano probabilmente da un comune precursore, le cellule da **carcinoma in situ** (CIS), noto anche come neoplasia germinale intratubulare. Si ritiene che le cellule CIS abbiano origine nel feto, poiché mostrano un fenotipo molecolare molto simile a quello delle cellule germinali primordiali/gonociti. La progressione a cellule neoplastiche avviene probabilmente in seguito a stimolazione ormonale al momento della pubertà che ne indurrebbe la proliferazione e successivamente la trasformazione in cellule tu-

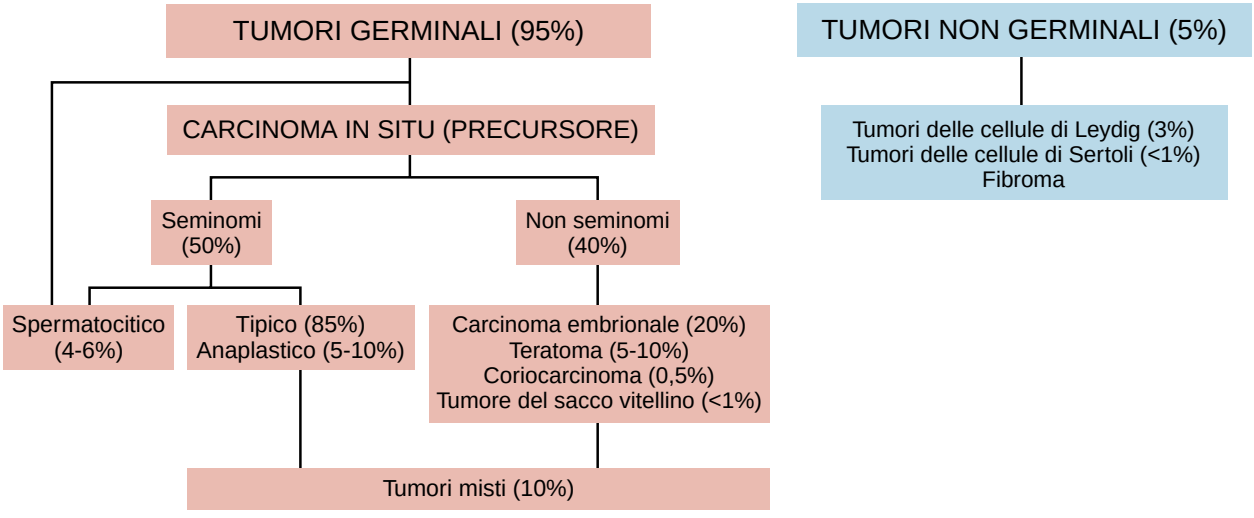



**Figura 6-20** ■ Classificazione dei tumori testicolari. In parentesi è indicata la frequenza relativa dei vari tipi di tumori.

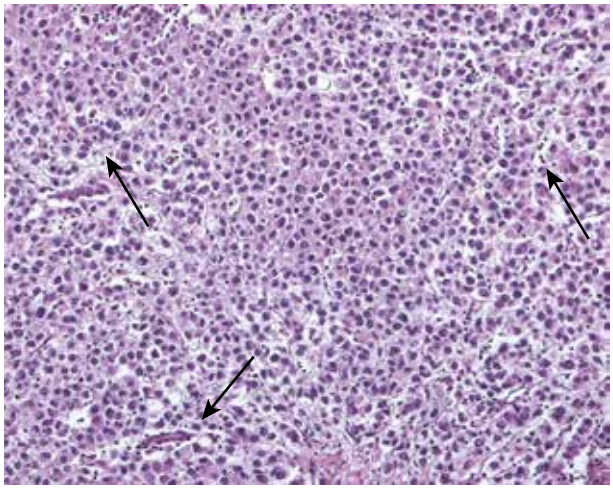


**Figura 6-21** ■ Fotografia al microscopio ottico di una sezione in paraffina di seminoma tipico. Le cellule tumorali hanno invaso l'intero parenchima distruggendo l'organizzazione tubulare. Lo stroma vascolarizzato è abbondante e ricco di infiltrati linfo-monocitari (frecce). (Fotografia di B. Muciaccia, Dipartimento di SAIMLAL, Sezione di Istologia ed Embriologia Medica, Sapienza Università di Roma)

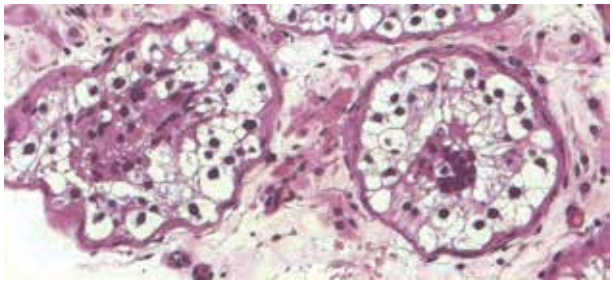


**Figura 6-22** ■ Fotografia al microscopio ottico di sezione in paraffina di carcinoma *in situ*. I tubuli sono privi di lume, contengono poche cellule germinali disposte alla periferia e cellule del Sertoli in posizione centrale. Si nota l'ispessimento della porzione peritubulare dovuta a deposito di matrice extracellulare e la presenza di infiltrato infiammatorio nel compartimento interstiziale. (Fotografia di B. Muciaccia, Dipartimento di SAIMLAL, Sezione di Istologia ed Embriologia Medica, Sapienza Università di Roma)

morali invasive. In tutti i casi, le cellule tumorali mostrano alterazione del cromosoma 12, in particolare aumentate copie del braccio corto del cromosoma 12 (12p, p dal francese *petit*), nello stesso cromosoma 12 o translocate altrove nel genoma. Il tempo medio per la progressione del CIS a malattia invasiva è 5 anni nel 50% dei casi e 7 anni nel 70%. La Figura 6-22 mostra l'istologia del CIS, caratterizzata da cellule grandi disposte a formare un singolo strato che poggia sulla membrana basale ispessita dei tubuli seminiferi, generalmente di diametro ridotto.

In generale i tumori testicolari da cellule germinali sono in lento ma costante aumento in tutti i paesi occidentali; l'incidenza annuale in Italia è aumentata da 6 a 8 casi su 100.000 maschi dal 1980 al 2000. D'altra parte, la mortalità è nettamente diminuita negli ultimi 50 anni grazie ai continui progressi delle conoscenze della loro origine, della chirurgia, della chemioterapia e della radiologia. Recentemente la prognosi dei tumori germinali è migliorata in modo sensibile tanto che oggi le neoplasie del testicolo sono probabilmente i tumori meglio curabili nell'adulto, soprattutto se la diagnosi è precoce. Attualmente negli USA e nel nostro Paese la mortalità tende a scendere sotto il 5%. La più semplice, ma affidabile, indagine diagnostica è attualmente l'ecografia con sonde ad alta frequenza. Inoltre nella diagnosi istopatologia l'impiego di marcatori rilevabili mediante immunoistochimica gioca un ruolo essenziale nel differenziare i vari sottotipi di tumori, mentre il monitoraggio nel siero di marcatori tumorali (quali l'alfa-fetoproteina, HCG) prodotti da alcuni tumori testicolari è di grande ausilio nella diagnosi e nella stadiazione della malattia, su cui è basata la decisione del trattamento.

## Bibliografia citata nel testo e letture consigliate

Amann RP. The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? Journal of Andrology 29, 469-487, 2008.

Bart J e coll. An oncologic view on the blood-testis barrier. The Lancet Oncology 3, 357-363, 2002.

Brinster RL. Male germline stem cells: from mice to men. Science 316, 404-405, 2007.

Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. Proc Natl Acad Sci USA 22, 91(24), 11303-11307, 1994.

Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. Proc Natl Acad Sci USA 22, 91(24), 11298-11302, 1994.

Chemes HE. Infancy is not a quiescent period of testicular development. International Journal of Andrology 24, 2-7, 2001.

Chikhovskaya JV e coll. Jonker human testis-derived embryonic stem cell-like cells are not pluripotent, but possess potential of mesenchymal progenitors. Hum Reprod 7, 210-221, 2012.

Conrad S e coll. Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. Nature 456, 344-349, 2008.

Cooke HJ, Saunders PT. Mouse models of male infertility. Nat Rev Genet 3, 790-801, 2002.

Cornwall G. New insights into epididymal biology and function. Human Reproduction Update 15(2), 213-227, 2009.

Dal Secco V e coll. Mouse Sertoli cells display phenotypical and functional traits of antigen-presenting cells in response to interferon gamma. Biology of Reproduction 78, 234-242, 2008.

Dubé E, Cyr DG. The blood-epididymis barrier and human male fertility. Adv Exp Med Biol 763, 218-236, 2012.

Ehmcke J e coll. Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives. Human Reproduction Update 12(3), 275-282, 2006.

Fijak M, Meinhardt A. The testis in immune privilege. Immunological Reviews 213, 66-81, 2006.

Filippini A e coll. Control and impairment of immune privilege in the testis and in semen. Human Reproduction Update 7, 444-449, 2001.

Heller CG, Clermont Y. Kinetics of the germinal epithelium in man. Recent Prog Horm Res 20, 545-571, 1964.

Holdcraft RW, Braun RE. Hormonal regulation of spermatogenesis. Int J Androl 27, 335-342, 2004.

Horwich A e coll. Testicular germ-cell cancer. Lancet 367, 754-765, 2006.

Levitas E e coll. Relationship between age and semen parameters in men with normal sperm concentration: analysis of 6022 semen samples. Andrologia 39(2), 45-50, 2007.

Looijenga LH e coll. Genomic and expression profiling of human spermatocytic seminomas: primary spermatocyte as tumorigenic precursor and DMRT1 as candidate chromosome 9 gene. Cancer Res 66, 290-302, 2006.

Meineke V. Human testicular mast cells contain tryptase: increased mast cells number and altered distribution in the testes of infertile men. Fert Steril 74, 239-244, 2000.

Mital P, Hinton B, Dufour J. The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. Biology of Reproduction 84(5), 851-858, 2011.

Nagano M, Ryu BY, Brinster CJ, Avarbock MR, Brinster RL. Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. Biol Reprod 68(6), 2207-2214, 2003.

Oosterhuis JW, Looijenga LH. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. Nat Rev Cancer 5, 210-222, 2005.

Petersen C, Soder O. The Sertoli cell. A hormonal target and "super" nurse for germ cells that determines testicular size. Horm Res 66, 153-161, 2006.

Prince FP. The triphasic nature of Leydig cell development in humans, and comments on nomenclature. Journal of Endocrinology 168, 213-216, 2001.

Riccioli A e coll. Presence of membrane and soluble forms of Fas ligand and of matrilysin (MMP-7) activity in normal and abnormal human semen. Hum Reprod 20, 2814-2820, 2005.

Romano F e coll. The contractile phenotype of peritubular smooth muscle cells is locally controlled: possible implications in male fertility. Contraception 72, 294-297, 2005.

Sadri-Ardekani H e coll. Propagation of human spermatogonial stem cells in vitro. JAMA 18, 2127-2134, 2009.

Schuppe HC e coll. Chronic orchitis: a neglected cause of male infertility? Andrologia 40, 84-91, 2008.

Seandel M, James D, Shmelkov SV, Falciatori I, Kim J, Chavala S, Scherr DS, Zhang F, Torres R, Gale NW, Yancopoulos GD, Murphy A, Valenzuela DM, Hobbs RM, Pandolfi PP, Rafii S. Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors. Nature 449(7160), 346-350, 2007.

Shum W, Ruan YC, Da Silva N, Breton S. Establishment of cell-cell cross talk in the epididymis: control of luminal acidification. Journal of Andrology 32(6), 576-586, 2011.

Sofikitis N e coll. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. J Steroid Biochem Mol Biol 109, 323-330, 2008.

Steding G. The anatomy of the human embryo. A scanning electron-microscopic atlas. Karger, Basel, 2009.

Tapia N e coll. Concise review: challenging the pluripotency of human testis-derived ESC-like cells. Stem Cells 29, 1165-1169, 2012.

Vilar O e coll. Histology of the human testis from neonatal period to adolescence. In: E Rosemberg, CA Paulsen (eds), The human testis. Advances in experimental medicine and biology, vol 10, Plenum Press, New York, 1970, pp 95-111.

Weinbauer GF e coll. Physiology of testicular function. In: E Nieschlag e coll (eds), Andrology male reproductive health and dysfunction, Springer-Verlag, 2010, pp 11-59.

Wu X e coll. Key factors in the regulation of fetal and postnatal Leydig cell development. J Cell Physiol 213, 429-433, 2007.

7

# Ovogenesi e apparato genitale femminile

Antonietta Salustri

## CENNI ANATOMICI DELL'APPARATO GENITALE FEMMINILE

L'apparato genitale femminile comprende le gonadi femminili o ovaie e le vie genitali (Fig. 7-1). Le **ovaie** sono organi pari dove ha luogo lo sviluppo e la maturazione degli ovociti. Nella donna misurano circa 3 cm di lunghezza, 1,5 cm di larghezza e 1 cm di spessore. Le **vie genitali** sono costituite da organi cavi la cui parete è formata da tessuto muscolare liscio e da una mucosa. Esse sono deputate, all'incontro dell'ovocito con gli spermatozoi, all'impianto dell'embrione e al suo sviluppo. Comprendono le tube uterine, l'utero e la vagina. Le **tube uterine**, lunghe all'incirca 10-12 cm, si aprono ad un'estremità nella cavità pelvica in prossimità di ogni ovaio, e all'altra nella cavità dell'utero. L'estremità aperta nella cavità pelvica, detta **infundibulo**, ha una forma ad imbuto e presenta dei margini sfrangiati chiamati **fimbrie**, che avvolgono l'ovaio e incanalano l'ovocito maturo in un'area allargata delle tube, l'**ampolla**, dove avviene la fecondazione. All'ampolla segue un segmento più ristretto, detto **istmo**, che la mette in comunicazione con l'utero, il quale è deputato ad accogliere l'embrione. L'**utero** ha una forma a pera rovesciata ed è lungo 6-7 cm, largo 3-4 cm e spesso 2-3 cm. La parte superiore più larga è detta **corpo**; a questa segue una parte intermedia più stretta, detta **istmo**, e una porzione inferiore, chiamata **collo** o **cervìce**, la quale è percorsa da un sottile canale, il **canale cervicale**, che mette in comunicazione la cavità uterina con la cavità vaginale. La **vagina**, che è lunga 7-9 cm, si estende dall'utero fino al suo orifizio esterno posto nel vestibolo della vulva. È nel fondo della vagina che vengono depositati gli spermatozoi i quali, per fecondare l'ovo-

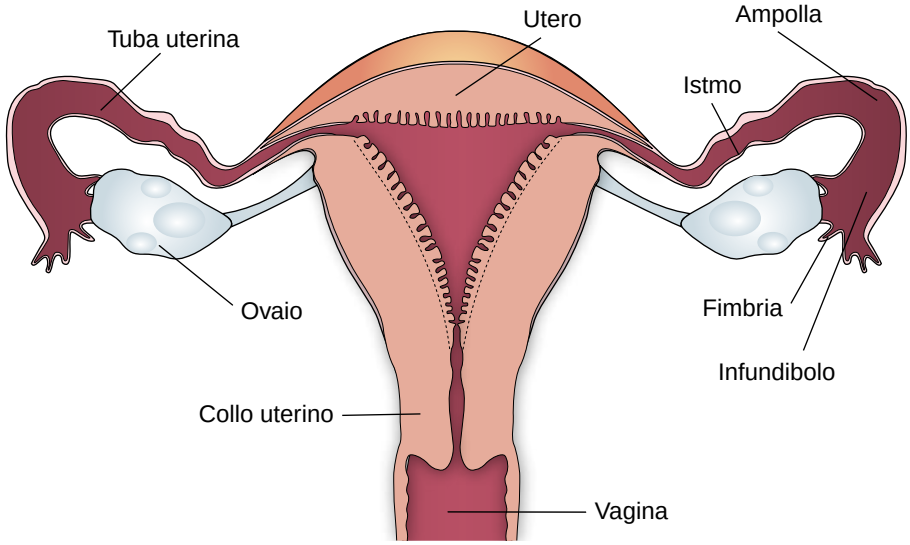



**Figura 7-1** Disegno schematico raffigurante la struttura generale dell'apparato genitale femminile.

cito, dovranno risalire attraverso l'utero e le tube per raggiungere l'ampolla.

Nella donna sessualmente matura l'ovaio, la tuba uterina, l'utero e la vagina subiscono notevoli cambiamenti di struttura e di attività funzionale durante il ciclo riproduttivo e la gravidanza. Tali modificazioni sono regolate da complessi meccanismi ormonali e nervosi che saranno sinteticamente discussi in seguito.

## L'ovaio

All'esame istologico l'ovaio appare ricoperto da un epitelio monostratificato di cellule cubiche (**epitelio germinativo**) al di sotto del quale si trova uno strato di tessuto connettivo compatto, la **tunica albuginea** (Fig. 7-2). La **zona centrale** o **midollare** è costituita principalmente da tessuto connettivo lasso in cui decorrono vasi e nervi. Nella **zona periferica** o **corticale**, sono presenti **follicoli** a diversi stadi di sviluppo. Ciascun follicolo consiste di un **ovocito** circondato da uno o più strati di **cellule follicolari** e costituisce l'unità funzionale dell'ovaio. Infatti, l'integrazione di segnali paracrini ed endocrini nel follicolo promuove lo sviluppo coordinato dell'ovocito e delle cellule follicolari, permettendo all'ovaio di svolgere due funzioni chiave per il successo riproduttivo: 1) la produzione di un ovocito fecondabile e capace di sostenere un normale sviluppo embrionale; 2) la secrezione di ormoni steroidei che influenzano le vie genitali ed in particolare la mucosa uterina, predisponendola all'impianto embrionale.

## I FOLLICOLI PRIMORDIALI E LA RISERVA OVOCITARIA

La gametogenesi femminile o **ovogenesi** ha inizio prima della nascita e questa fase prenatale sarà trattata in modo esteso nel Capitolo 16. In breve, prima della nascita nell'ovaio gli **ovogoni**, dopo una serie di divisioni mitotiche, iniziano la meiosi diventando **ovociti primari**. Dopo aver attraversato tutti gli stadi della profase, gli ovociti primari si arrestano nello stadio di diplotene e vengono circondati da uno strato di cellule somatiche appiattite, le **cellule follicolari**, formando i **follicoli primordiali**. Poiché alla nascita l'ovaio non dispone più di ovogoni mitoticamente attivi, l'insieme dei follicoli primordiali costituisce l'intera riserva di ovociti che, non potendo più essere rinnovata, è destinata a diminuire nel tempo (vedi più avanti). Dalla nascita fino alla pubertà, alcuni follicoli primordiali e gli ovociti in essi racchiusi iniziano a crescere, ma non completano il loro sviluppo e degenerano attraverso un processo chiamato **atresia** (vedi più avanti). La sopravvivenza dei follicoli e

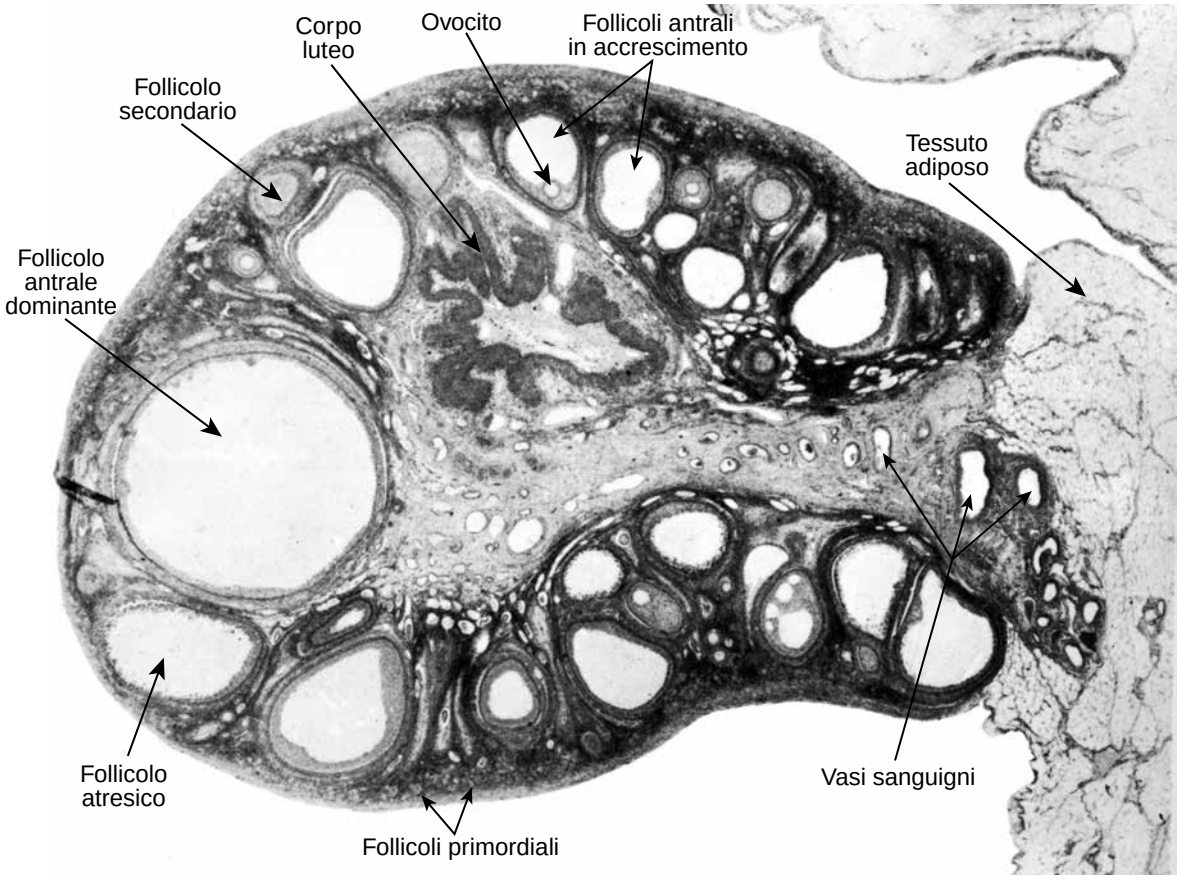



**Figura 7-2** ■ Microfotografia di sezione di ovaio di Macacus rhesus. Ingrandimento 8×. (*Da* H. Mizoguchi).

il completamento dello sviluppo dipendono, infatti, da adeguati livelli ematici di ormoni gonadotropici o **gonadotropine**, **FSH** (follicle stimulating hormone) e **LH** (luteinizing hormone), che vengono raggiunti soltanto alla **pubertà**, quando l'**ipofisi**, deputata alla loro sintesi, diventa pienamente funzionale. Tuttavia, anche nel periodo fertile si assiste a una cospicua degenerazione dei follicoli. Durante questo periodo la quantità di gonadotropine secrete dall'ipofisi non è costante, ma varia ciclicamente ogni 28 giorni circa. Di norma nella donna soltanto un follicolo completa lo sviluppo ogni mese, liberando un ovocito maturo per la fecondazione (**ovulazione**). È stato calcolato che, del milione di ovociti presenti nelle due ovaie alla nascita, ne rimangono 400.000 alla pubertà. Di questi soltanto 300-400 riprendono la meiosi e sono ovulati durante la vita fertile. L'esaurimento della riserva ovocitaria si verifica all'incirca verso i 50 anni e determina la fine del periodo fertile e l'ingresso della donna in **menopausa**. L'assenza di cellule staminali o ovogoni nell'ovaio riveste una notevole importanza clinica: agenti nocivi, quali le radiazioni ionizzanti e composti chemioterapici, che danneggiano gli ovociti, determinano danni irreparabili e sterilità precoce nella donna.

Nel Capitolo 16 si fa menzione di recenti lavori che riportano la possibilità che nuovi ovociti e follicoli primordiali vengano formati anche dopo la nascita. Numerose ricerche sono in corso per verificare questi risultati che, se confermati, ci indurrebbero a riscrivere parte di questo capitolo.

## LO SVILUPPO DEL FOLLICOLO

Nella donna la trasformazione di un follicolo primordiale in un follicolo ovulatorio (**follicologenesi**) è un processo molto lungo durante il quale la crescita e la maturazione dell'ovocito procedono parallelamente a cambiamenti morfologici e funzionali delle cellule follicolari. Lo sviluppo del follicolo può essere schematicamente suddiviso in tre fasi: preantrale, antrale e ovulatoria.

### La fase preantrale

I follicoli primordiali possono restare in uno stato quiescente anche per molti anni. Tuttavia, diversi follicoli primordiali sono continuamente indotti, da stimoli intraovarici ancora poco conosciuti, a crescere e a trasformarsi in **follicoli primari** (Fig. 7-3A). Nel follicolo pri-

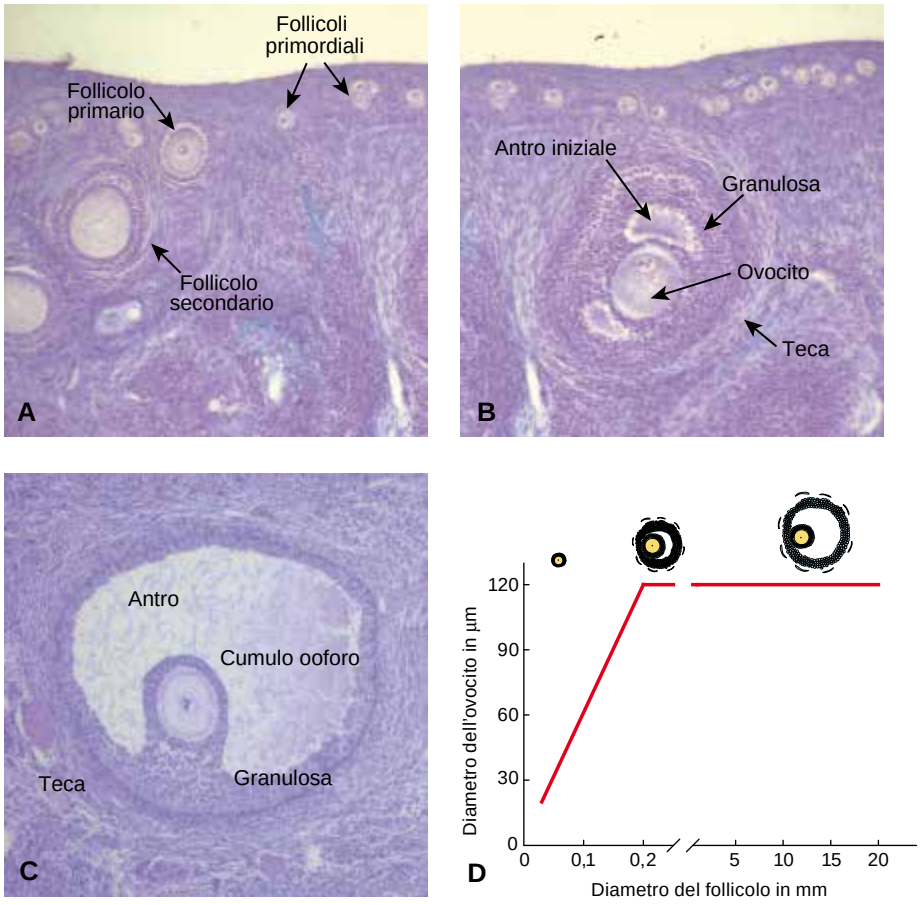



**Figura 7-3** ■ *A,B,C)* Sezioni di ovaio di coniglio che mostrano stadi diversi dello sviluppo del follicolo ovarico. (*Da* S. Adamo e coll., Istologia di V. Monesi, V edizione, III ristampa, Piccin Nuova Libraria, Padova, 2002). *D)* Il grafico mostra l'andamento della crescita dell'ovocito in relazione alla crescita del follicolo.

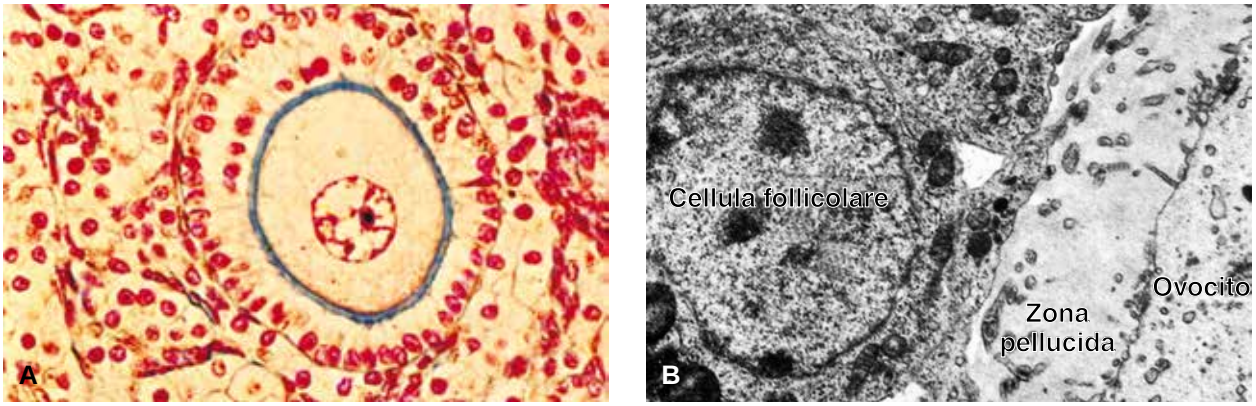



**Figura 7-4** ■ *A)* Un follicolo primario di coniglio in cui è ben visibile la zona pellucida colorata in blu dalla miscela azan-Mallory (*Da* S. Adamo e coll., Istologia di V. Monesi, V edizione, III ristampa, Piccin Nuova Libraria, Padova, 2002). *B)* Microfotografia elettronica di un follicolo di topo in cui è possibile osservare i prolungamenti citoplasmatici delle cellule follicolari che attraversano la zona pellucida (*Da* D.L. Odor).

mario le cellule follicolari assumono una forma cubica, iniziano a proliferare e sintetizzano una membrana basale, che viene depositata alla periferia del follicolo. Contemporaneamente l'ovocito aumenta in volume (**accrescimento dell'ovocito**) per un'intensa attività di sintesi di RNA e di proteine che vengono accumulati nel citoplasma per essere utilizzati negli stadi successivi di maturazione e nelle prime fasi embrionali. L'ovocito, inoltre, comincia a secernere delle glicoproteine che formano un rivestimento acellulare interposto tra questo e le cellule follicolari, la **zona pellucida** (vedi Capitolo 8). Nel topo, la specie in cui la zona pellucida è stata studiata nel maggior dettaglio, essa è costituita da tre glicoproteine, chiamate ZP1, ZP2 e ZP3. Le ultime due interagiscono in modo non covalente per formare lunghi filamenti, che sono interconnessi da ponti ZP1. La zona pellucida è attraversata da lunghi e sottili prolungamenti citoplasmatici delle cellule follicolari che si mettono in contatto con la membrana dell'ovocito o **ovolemma**, formando giunzioni di tipo gap, attraverso le quali vengono fornite all'ovocito piccole molecole segnale e sostanze nutritive (Fig. 7-4).

Numerose giunzioni gap si formano anche tra le cellule follicolari. Questa complessa rete di comunicazione, insieme ai fattori di crescita secreti dall'ovocito e dalle cellule follicolari, permettono la stimolazione e il controllo reciproco della componente germinale e somatica, trasformando il follicolo in un sistema funzionale integrato. Gli ovociti stimolano le cellule follicolari a proliferare più intensamente. Si passa così dal follicolo primario unilaminare al **follicolo secondario** multilaminare (Fig. 7-3A). Le cellule follicolari a loro volta sostengono la crescita dell'ovocito, che dagli iniziali 20 µm di diametro raggiunge i 100 µm con un aumento di volume di più di 100 volte. Durante questa fase della crescita ovocitaria, specifici geni vengono inattivati mediante modificazioni epigenetiche, che consistono principalmente nella metilazione del DNA. Questo processo, definito **imprinting genomico**, si verifica anche nelle cellule germinali maschili, ma interessa altri geni. Come vedremo più avanti (Capitolo 8), queste modificazioni genomiche sesso-specifiche nei gameti sono essenziali per un corretto sviluppo embrionale e postnatale. Il follicolo multilaminare induce inoltre le vicine cellule del connettivo a disporsi in più strati concentrici attorno ad esso formando la **teca del follicolo** (Fig. 7-3B). Le cellule della teca si differenziano in uno strato interno molto vascolarizzato, la **teca interna**, e uno strato esterno più compatto e ricco di fibre collagene, la **teca esterna**. La membrana basale separa le cellule follicolari da quelle tecali, e i capillari della teca interna non penetrano negli strati delle cellule follicolari, che pertanto vengono nutriti e ossigenati per diffusione. Le cellule follicolari cominciano ad esprimere sulla loro membrana i **recettori per l'ormone follicolo stimolante** (**FSH**) e quelle della teca interna i **recettori per l'ormone luteinizzante** (**LH**). Questo segna un cambiamento importante; infatti, il passaggio alla fase successiva di sviluppo follicolare dipende da questi ormoni ipofisari.

## La fase antrale

Quando le cellule follicolari hanno formato 6-10 strati attorno all'ovocito ed il follicolo ha raggiunto il diametro di circa 200 µm, compaiono tra le cellule follicolari piccoli spazi che presto confluiscono in un'unica cavità, denominata **antro del follicolo** (Fig. 7-3B). Questo è ripieno di un liquido chiaro, chiamato **liquido follicolare**, costituito da un essudato del plasma dai capillari tecali e da prodotti secreti dall'ovocito e dalle cellule follicolari. Questi cambiamenti caratterizzano il passaggio da follicolo preantrale a **follicolo antrale**.

Quando l'antro comincia a formarsi, l'ovocito raggiunge la sua dimensione definitiva di circa 120 µm e cessa di accrescersi, mentre il follicolo continua ad ingrandirsi (Fig. 7-3D). Con l'ampliarsi dell'antro, l'ovocito assume una posizione eccentrica e sporge dalla parete follicolare nella cavità circondato da una piccola massa di cellule, che prendono il nome di **cellule del cumulo ooforo** (Fig. 7-3C). Le cellule più interne, dette cellule

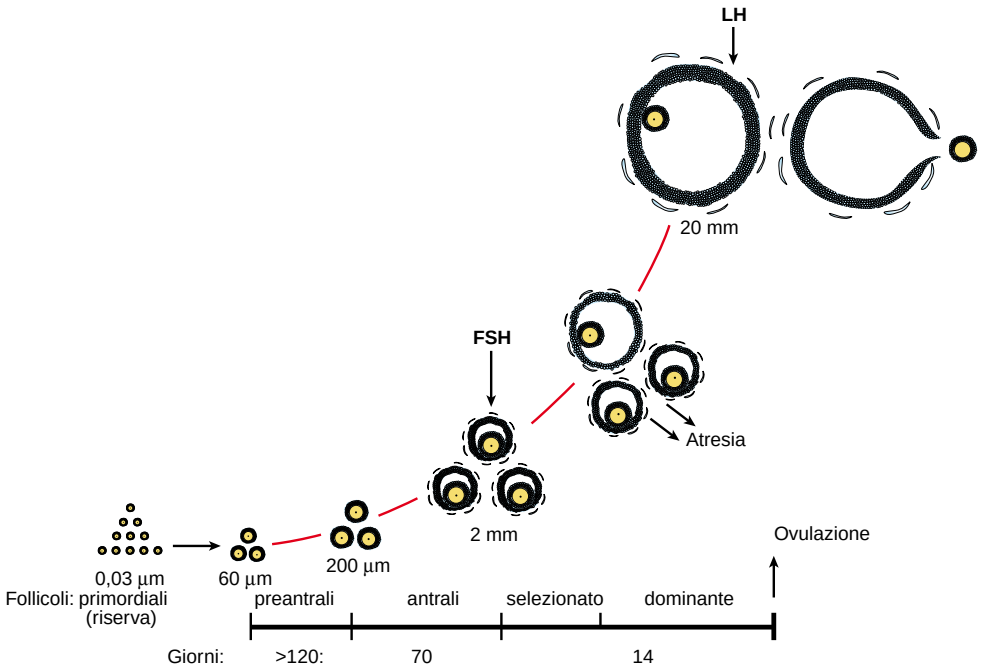



**FIGURA 7-5** ■ Rappresentazione schematica dell'andamento temporale dello sviluppo del follicolo umano.

della **corona radiata**, rimangono in contatto con l'ovocito attraverso i prolungamenti che attraversano la zona pellucida. La maggior parte delle cellule follicolari formano invece la parete stratificata del follicolo, e prendono il nome di **cellule della membrana granulosa**.

È stato calcolato che nella donna un follicolo primario di 60 µm impiega circa 4 mesi per diventare un follicolo preantrale di 200 µm, e più di 2 mesi per trasformarsi in un follicolo antrale di 2 mm. Raggiunto questo stadio, il follicolo diventa sensibile ai cambiamenti ciclici di gonadotropine e cresce in modo esponenziale raggiungendo un diametro di 1,5-2 cm in 14 giorni (Fig. 7-5). È infatti l'**FSH** che induce un incremento dell'attività proliferativa nelle cellule della granulosa e un rapido aumento del liquido follicolare. In media circa 3-10 follicoli antrali ogni mese vengono stimolati dall'FSH a progredire nello sviluppo, ma soltanto uno, detto **follicolo dominante** (o **follicolo di Graaf**), completa la crescita (Fig. 7-5). Tutti gli altri vanno incontro ad atresia: le cellule follicolari sviluppano nuclei picnotici e degenerano attraverso un processo apoptotico, a cui fa seguito poco dopo la morte dell'ovocito. La loro rimozione da parte di leucociti e macrofagi trasformano il follicolo in un tessuto fibroso cicatriziale detto **corpo atresico**.

Sotto l'azione dell'FSH, il follicolo selezionato diventa una vera ghiandola endocrina che secerne grandi quantità di ormoni **estrogeni** (estradiolo-17β ed estrone). La produzione di questi ormoni da parte del follicolo è un processo cooperativo tra cellule della teca interna e cellule della granulosa (Fig. 7-6). Le cellule della teca

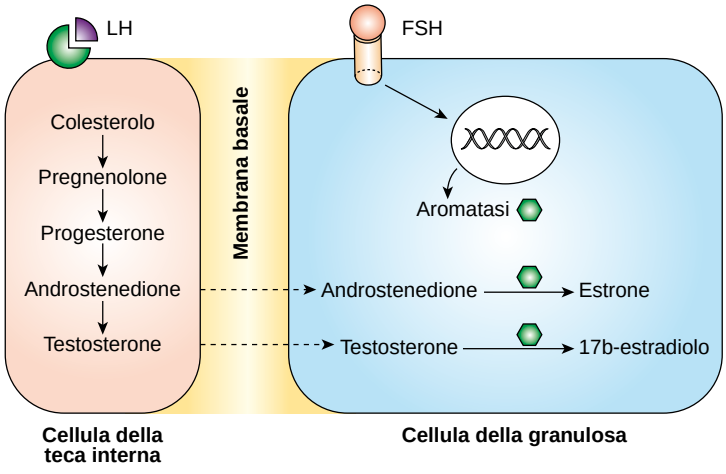



**FIGURA 7-6** ■ Schema della co-operazione tra cellule della teca e cellule della granulosa nella sintesi di steroidi.

interna, infatti, sono stimolate dall'LH a produrre androgeni, per la maggior parte **androstenedione** e **testosterone**, che vengono convertiti in estrogeni dalle cellule della granulosa stimolate dall'FSH a produrre l'aromatasi. Gli estrogeni rivestono un ruolo essenziale nel creare le condizioni per l'ultima fase di sviluppo follicolare, agendo sia localmente che distalmente, per la loro diffusione nel sangue attraverso i capillari tecali. Infatti, gli estrogeni agiscono sulle stesse cellule della granulosa (**azione autocrina**), e insieme all'FSH promuovono la comparsa dei **recettori per l'LH** sulla membrana di queste cellule. Inoltre, quando hanno raggiunto una elevata concentrazione nel circolo, gli estrogeni agiscono con un meccanismo retroattivo (**feedback positivo**) **sull'asse ipotalamo-ipofisario** (**azione endocrina**) provocando il rilascio massivo di gonadotropine da parte dell'ipofisi, soprattutto di LH, che innesca la fase ovulatoria.

## La fase ovulatoria

Il brusco aumento di **LH** circolante scatena una serie di eventi nel follicolo dominante, che si concludono 36 ore dopo con l'ovulazione. Sotto lo stimolo dell'ormone LH, le cellule della granulosa producono segnali che si propagano alle cellule del cumulo ooforo e all'ovocito.

Le cellule del cumulo ooforo retraggono i prolungamenti citoplasmatici che le mettono in comunicazione con l'ovocito e secernono una grande quantità di una matrice extracellulare viscoelastica, principalmente costituita da **acido ialuronico** (Fig. 7-7), che porta ad un notevole aumento delle dimensioni del cumulo ooforo (Fig. 7-8). Questo processo, detto **espansione** o **mucificazione del cumulo ooforo**, provoca il distacco del cumulo e dell'ovocito in esso racchiuso dalla parete follicolare.

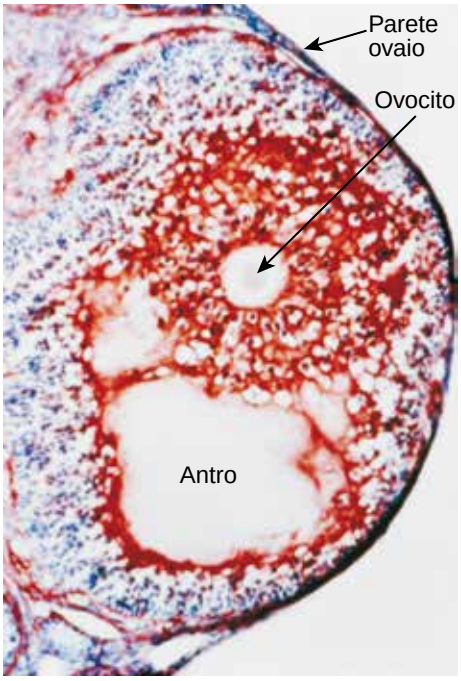



**Figura 7-7** ■ Microfotografia di un follicolo preovulatorio di topo. Nota nel cumulo ooforo l'abbondanza della matrice extracellulare ricca in acido ialuronico (in rosso).

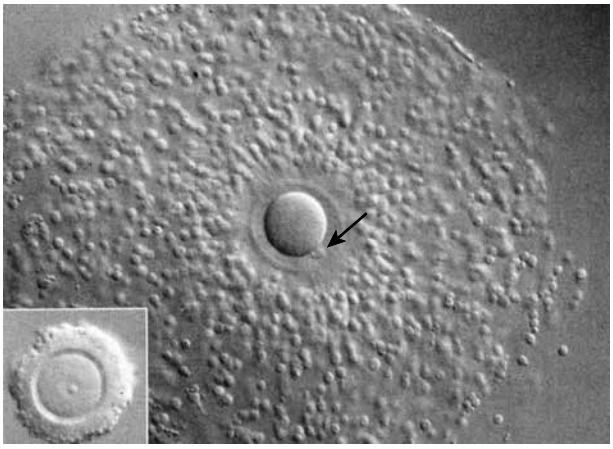


**Figura 7-8** ■ Cumuli oofori di topo isolati prima (inserto) e dopo il picco ovulatorio di LH. Nota l'espansione del cumulo ooforo e negli ovociti la scomparsa dell'involucro nucleare e l'emissione del primo globulo polare (freccia). (*Da* S. Adamo e coll., Istologia di V. Monesi, V edizione, III ristampa, Piccin Nuova Libraria, Padova, 2002).

Contemporaneamente l'ovocito è indotto a uscire dal blocco in profase (diplotene) della prima divisione meiotica in cui è rimasto per molti anni. I cromosomi si accorciano e si ispessiscono e contemporaneamente si arresta la sintesi di RNA. L'involucro nucleare scompare e le coppie di cromosomi omologhi si dispongono sul fuso, localizzato al di sotto e parallelamente all'ovolemma (metafase I). Successivamente il fuso ruota di 90°, disponendosi perpendicolarmente alla membrana plasmatica, e l'ovocito prosegue nella meiosi, andando incontro alla anafase I e telofase I. Come conseguenza della posizione eccentrica del fuso, al termine della telofase I, l'ovocito primario dà origine a due cellule figlie di dimensioni assai diverse, ognuna contenente la metà del corredo cromosomico: l'**ovocito secondario**, contenente quasi tutto il citoplasma, e un **primo globulo polare**, posto tra l'oolemma e la zona pellucida (**spazio perivitellino**), che contiene poco citoplasma (Fig. 7-8). Immediatamente l'ovocito secondario inizia la seconda divisione meiotica ma, arrivato allo **stadio di metafase II**, entra nel secondo blocco della meiosi. Come vedremo più avanti, nel Capitolo 8, solo se verrà fecondato l'ovocito potrà riprendere e completare la meiosi. Oltre alla maturazione nucleare, avvengono cambiamenti nel citoplasma dell'ovocito che lo preparano alla fecondazione. Tra questi va ricordata la migrazione al di sotto dell'ovolemma dei **granuli corticali**, vescicole ripiene di enzimi formatesi durante l'accrescimento dell'ovocito.

L'LH induce inoltre una serie di cambiamenti nella parete follicolare (granulosa e teca) che presentano diverse analogie con una reazione infiammatoria. La permeabilità dei vasi sanguigni nella teca interna aumenta

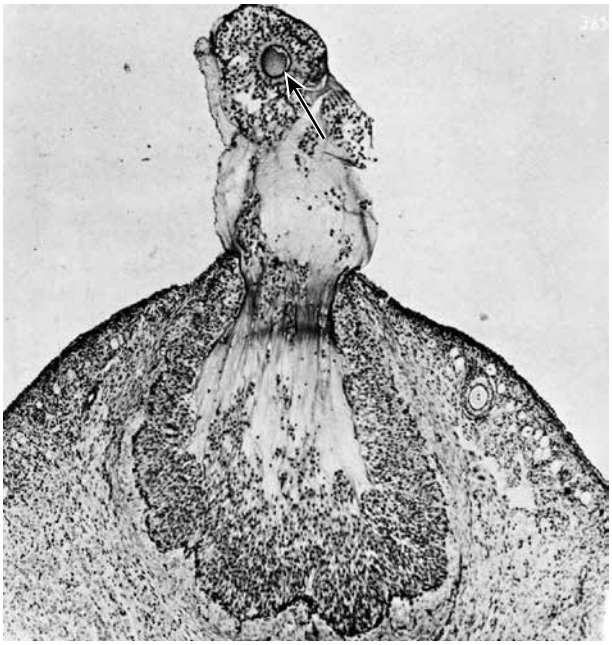


**Figura 7-9** ■ Microfotografia di follicolo di ratto al momento dell'ovulazione. L'uovo (freccia), circondato dal cumulo ooforo, è espulso dal follicolo. (*Da* R.G. Blandau).

e determina un brusco incremento del liquido follicolare. Il follicolo ovulatorio assume così l'aspetto di una grossa vescicola del diametro di circa 2,5 cm, che sporge sulla superficie dell'ovaio. Circa 36 h dopo il picco di LH, il tratto di parete del follicolo rivolto verso la superficie dell'ovaio e la tonaca albuginea soprastante si assottigliano formando un'area traslucida denominata **stigma**. Entro pochi minuti la parete del follicolo e quella dell'ovaio in corrispondenza dello stigma si rompono (**rottura** o **deiscenza del follicolo**) e il cumulo ooforo, spinto dal flusso del liquido follicolare verso il sito di rottura, lentamente sguscia dal follicolo portando l'ovocito sulla superficie ovarica. Questo processo è denominato **ovulazione** (Fig. 7-9). I fenomeni che portano alla rottura del follicolo sono complessi e non del tutto chiariti. Un importante ruolo sembra essere giocato dalla degradazione della matrice extracellulare sia della teca che della tonaca albuginea ad opera di enzimi proteolitici, come le collagenasi e le gelatinasi, secreti dalle cellule della granulosa. Nel meccanismo ovulatorio sembrano essere implicate le **prostaglandine**, un noto mediatore dell'infiammazione. Infatti l'LH stimola la produzione di prostaglandine nelle cellule della granulosa e la somministrazione di inibitori della loro sintesi (antinfiammatori non steroidei) inibisce l'ovulazione.

Subito dopo l'ovulazione il cumulo ooforo è sospinto nell'ampolla tubarica dalle fimbrie della tuba uterina. Qui l'ovocito rimane vitale e fecondabile per circa 24 ore. In assenza di fecondazione, l'ovocito e le cellule del cumulo degenerano e i residui cellulari vengono fagocitati dai leucociti presenti nel fluido tubarico.

## FORMAZIONE DEL CORPO LUTEO

Dopo l'ovulazione, quello che rimane nell'ovaio del follicolo maturo (cellule della granulosa e della teca) si trasforma in una nuova ghiandola endocrina, il **corpo luteo** (Fig. 7-10). La parete del follicolo collassa, la mem-

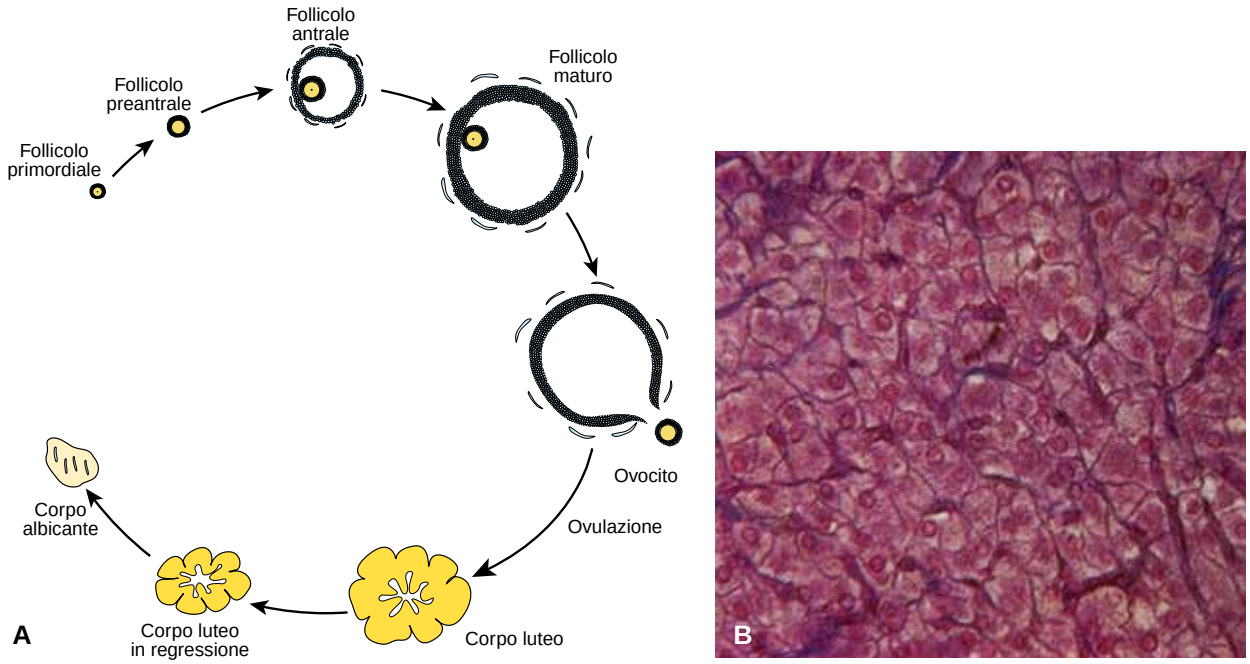



**Figura 7-10** ■ *A)* Rappresentazione schematica dello sviluppo del follicolo e del corpo luteo. *B)* Microfotografia di sezione di corpo luteo di coniglio (*Da* S. Adamo e coll., Istologia di V. Monesi, V edizione, III ristampa, Piccin Nuova Libraria, Padova, 2002).

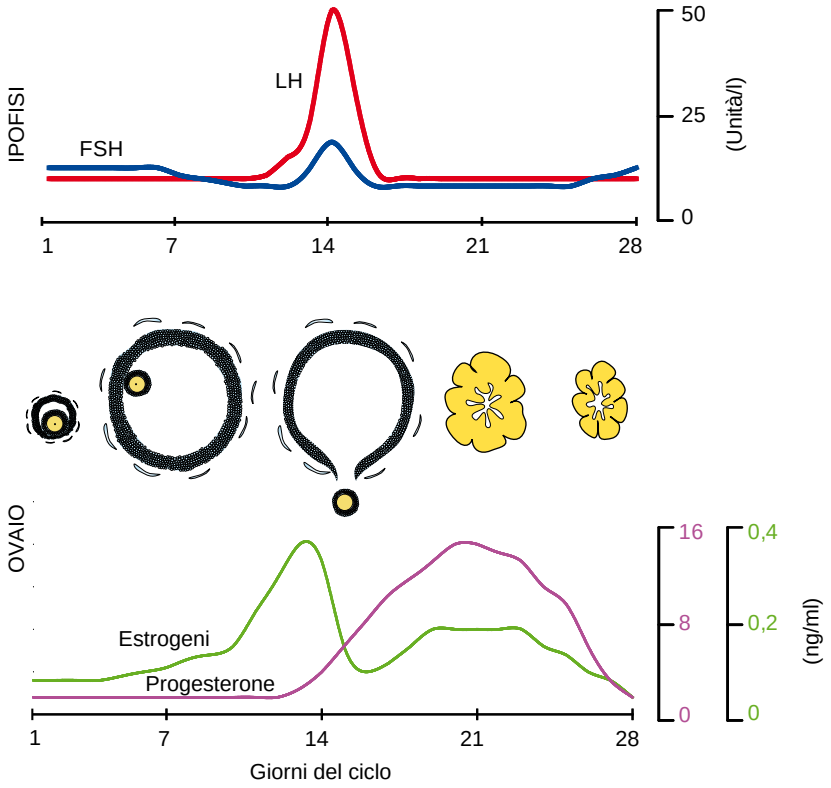



**Figura 7-11** ■ Le variazioni mensili delle concentrazioni nel sangue delle gonadotropine rilasciate dall'ipofisi e degli ormoni steroidei secreti dall'ovaio durante la maturazione del follicolo (fase follicolare) e lo sviluppo del corpo luteo (fase luteinica).

brana basale si depolimerizza, e i capillari invadono gli strati delle cellule della granulosa formando intorno a questi elementi una ricca rete capillare in un delicato reticolo di fibre collagene. Le cellule della granulosa e della teca si trasformano in **cellule luteiniche** che secernono elevate quantità di **progesterone**, ed in quantità minore **estrogeni**. Sotto l'azione dell'LH, il corpo luteo continua a produrre ormoni per circa 10 giorni. Se l'uovo non è fecondato, il corpo luteo (che è denominato **corpo luteo mestruale**) inizia a regredire, riducendo drasticamente la produzione di ormoni. Due giorni dopo le cellule luteiniche degenerano e il corpo luteo si trasforma in una cicatrice bianca denominata **corpo albicante**. Questa struttura persiste per molti mesi e poi scompare lentamente.

Se invece l'uovo è fecondato, l'embrione dopo circa 7 giorni si impianta nell'utero e inizia a secernere un ormone proteico simile all'LH, la gonadotropina corionica (**hCG**, human chorionic gonadotropin), il quale, sostituendosi all'LH, impedisce la regressione del corpo luteo. Questo, ora definito **corpo luteo gravidico**, può pertanto continuare a secernere progesterone ed estrogeni. La sua lenta involuzione inizierà soltanto dopo il terzo mese di gravidanza, allorché il compito di produrre tali ormoni verrà assunto dalla placenta (vedi Capitolo 20).

Il **progesterone** e gli **estrogeni** secreti dal corpo luteo inibiscono, con un meccanismo di **feedback negativo** sull'asse ipotalamo-ipofisario, la liberazione di FSH e LH, impedendo che altri follicoli in accrescimento giungano a maturazione ed ovulino durante la fase luteinica. Soltanto dopo la regressione del corpo luteo e la diminuzione della concentrazione nel sangue di questi ormoni l'ipofisi potrà riprendere a produrre quantità di gonadotropine sufficienti a stimolare la crescita dei follicoli antrali, dando inizio ad un nuovo ciclo.

## IL CICLO OVARICO

L'insieme delle modificazioni ciclicamente indotte dalle gonadotropine nell'ovaio all'incirca ogni **28 ± 7,5 giorni** costituisce il **ciclo ovarico**, che può essere suddiviso in due periodi: un primo periodo di circa 14 giorni, detto **fase follicolare**, che comprende la selezione, lo sviluppo e l'ovulazione del follicolo dominante, ed è caratterizzato dalla secrezione di estrogeni; un secondo periodo anch'esso di circa 14 giorni, detto **fase luteinica**, caratterizzato dallo sviluppo del corpo luteo e dalla secrezione prevalente di progesterone (Fig. 7-11).

Queste modificazioni cicliche che avvengono nell'ovaio ogni mese determinano importanti cambiamenti nell'utero.

## IL CICLO UTERINO

La cavità dell'utero è rivestita da una mucosa (**endometrio**), costituita da un epitelio cilindrico semplice da cui

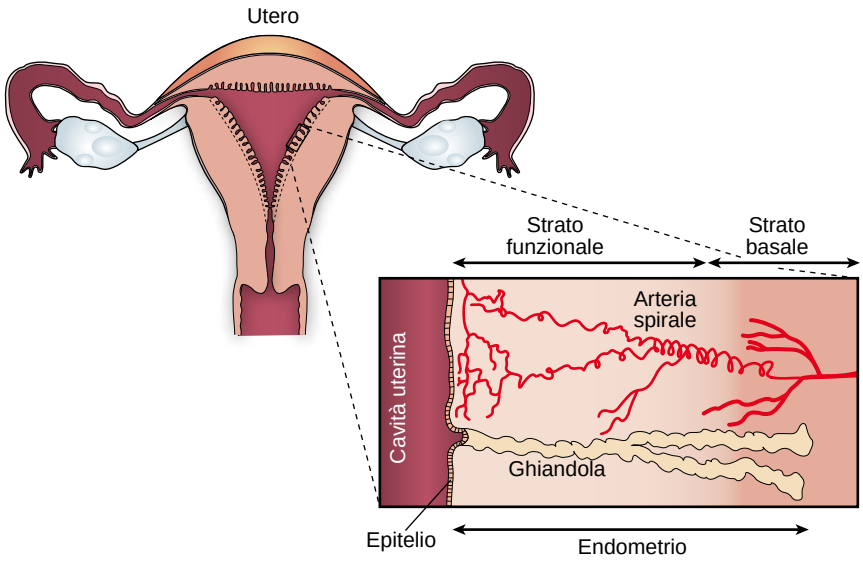



**FIGURA 7-12** ■ Schema della struttura istologica dell'endometrio umano nella fase secretiva.

originano lunghe ghiandole tubulari, e dal sottostante connettivo vascolarizzato da arterie che hanno un andamento tortuoso, le **arterie spirali** (Fig. 7-12). Da un punto di vista funzionale l'endometrio viene distinto in due regioni: lo **strato funzionale**, più superficiale, che degenera e si distacca durante la mestruazione e lo **strato basale**, più profondo, che rigenera lo strato funzionale dopo il flusso mestruale.

Le modificazioni che ogni mese si verificano nella mucosa dell'utero parallelamente al ciclo ovarico costituiscono il **ciclo uterino**. Per convenzione, viene considerato giorno 1 del ciclo uterino il giorno della comparsa del flusso mestruale. Questi cambiamenti dell'utero, che hanno lo scopo di preparare l'endometrio ad accogliere l'embrione, sono sotto il diretto controllo degli ormoni steroidei prodotti dall'ovaio (Fig. 7-13).

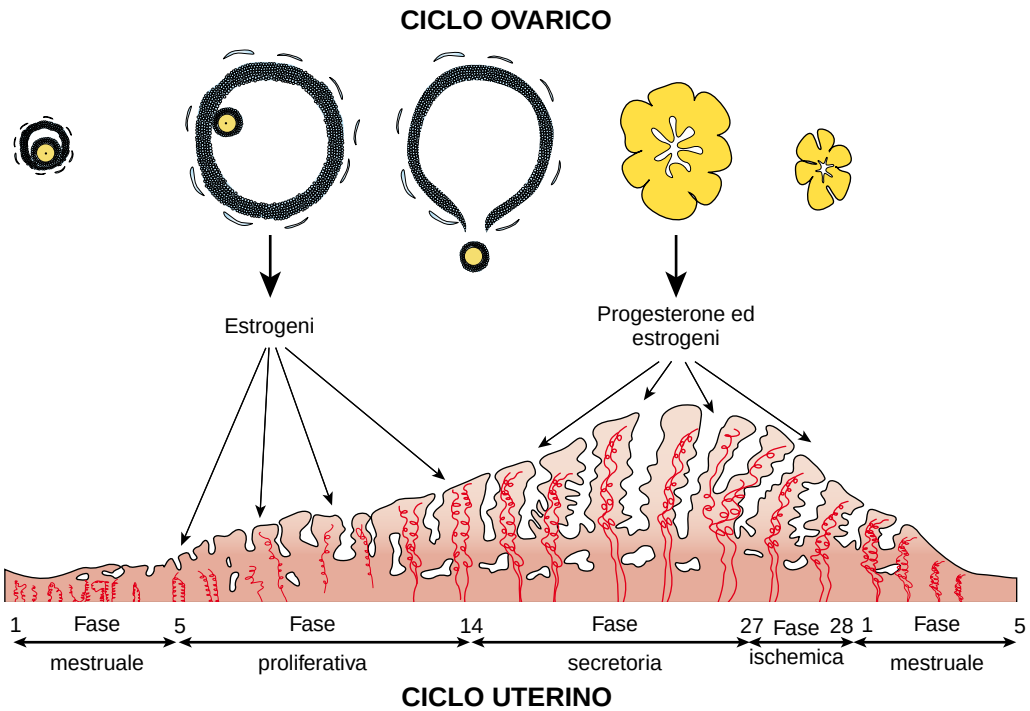



**FIGURA 7-13** ■ Disegno schematico dei cambiamenti dell'endometrio (ciclo uterino) indotti dagli ormoni steroidei prodotti durante il ciclo ovarico.

Il ciclo uterino può essere suddiviso in tre fasi: la fase proliferativa, la fase secretiva e la fase mestruale.

La **fase proliferativa** (o **follicolare**) segue ad ogni mestruazione e coincide con la fase follicolare dell'ovaio. Gli estrogeni prodotti dal follicolo dominante stimolano l'attività mitotica delle cellule stromali e delle cellule epiteliali del fondo ghiandolare presenti nello strato basale. La continua proliferazione di queste cellule rigenera l'epitelio di rivestimento, le ghiandole mucose e il connettivo dello strato funzionale. Questo porta ad un aumento dello spessore dell'endometrio che passa da 1 a circa 3 mm.

A questa segue la **fase secretiva** (o **luteinica**), che inizia dopo l'ovulazione con la formazione nell'ovaio del corpo luteo. Sotto lo stimolo del progesterone prodotto dal corpo luteo le ghiandole si allungano e si dilatano per l'accumulo di un secreto ricco di glicogeno e mucine, le cellule connettivali aumentano di volume accumulando nel citoplasma lipidi e glicogeno, e le arterie spirali si dilatano, facendo assumere un aspetto edematoso all'endometrio, che aumenta di spessore fino a 5-6 mm. L'endometrio è ora pronto ad accogliere e nutrire l'embrione nelle prime fasi di sviluppo (vedi Capitolo 9).

La **fase mestruale** inizia due settimane dopo l'ovulazione, se non è avvenuta la fecondazione. L'involuzione del corpo luteo e la conseguente drastica riduzione dei livelli di progesterone nel sangue provocano nello strato funzionale dell'endometrio notevoli modificazioni vascolari. Le arterie spirali subiscono cicli intermittenti di costrizione che provocano arresti momentanei del flusso sanguigno (ischemìa). La secrezione ghiandolare e l'edema dello stroma si riduce. Dopo circa due giorni, le arterie spirali subiscono una costrizione più prolungata e le cellule cominciano a degenerare per il diminuito apporto di ossigeno. Quando le arterie si riaprono, la parete vasale danneggiata dall'ischemia cede e l'intero strato funzionale necrotizzato si distacca ed è espulso insieme al sangue che si riversa nella cavità uterina. Questo fenomeno prende il nome di **mestruazione** o **flusso mestruale** e dura 3-5 giorni. Queste variazioni vascolari non riguardano lo strato basale che pertanto rimane integro e può rigenerare una nuova zona funzionale con l'inizio di un nuovo ciclo ovarico.

Se l'uovo viene fecondato e l'embrione generato si impianta, l'hCG prodotto dalla placenta in via di sviluppo continua a stimolare la secrezione di progesterone ed estrogeni dal corpo luteo e il flusso mestruale non si verifica; anzi, le modificazioni che avvengono nell'endometrio durante la fase secretiva si accentuano trasformando la mucosa uterina in **decidua gravidica**.

## ALTRI EFFETTI DEL CICLO OVARICO SULLE VIE GENITALI

Durante la fase follicolare del ciclo ovarico le fimbrie delle **tube uterine** diventano più turgide sotto l'azione degli estrogeni e si avvicinano all'ovaio con movimenti ondulatori; inoltre, le cellule ciliate dell'epitelio tubarico aumentano di numero e le cellule secretorie incrementano la loro attività. Il movimento delle fimbrie, il battito ciliare e il fluido facilitano la cattura del cumulo ooforo e il suo trasporto all'interno della tuba.

Parallelamente, gli estrogeni promuovono la secrezione di un muco fluido da parte dell'epitelio che riveste la **cervice uterina**, che ha lo scopo di lubrificare la vagina (che è priva di ghiandole) e di facilitare il transito degli spermatozoi. Dopo l'ovulazione il muco diventa scarso e viscoso rendendo più difficile la penetrazione degli spermatozoi.

Nella fase di dominanza degli estrogeni, l'epitelio stratificato della **vagina** si ispessisce per un aumento della proliferazione cellulare e le cellule più superficiali si riempiono di glicogeno. Durante la fase luteinica, le cellule superficiali desquamano e il glicogeno viene scisso in acido lattico ad opera di lattobacilli fisiologicamente presenti nella cavità vaginale producendo un abbassamento del pH, che ha lo scopo di proteggere la vagina dalle infezioni in vista di un eventuale impianto dell'embrione.

## PROCESSI E MOLECOLE

### *Il controllo ormonale del ciclo ovarico e la selezione follicolare*

Come abbiamo accennato, il ciclo ovarico è regolato da una complessa interazione tra ovaio, ipofisi e sistema nervoso centrale che converrà ora ricapitolare e approfondire in alcuni aspetti. L'**ipofisi** è una piccola ghiandola, posta alla base del cervello, regolata nella sua attività secretoria da neuroni che si trovano in aree circoscritte dell'**ipotalamo**. Questi neuroni producono l'ormone di rilascio delle gonadotropine (**GnRH**, gonadotropin releasing hormone) che, immesso in un circolo sanguigno locale, rapidamente raggiunge l'ipofisi e la stimola a liberare l'**FSH** e l'**LH**. Perciò l'ipotalamo e l'ipofisi costituiscono una unità funzionale nota come **asse ipotalamo-ipofisario**. Le gonadotropine stimolano il follicolo e poi il corpo luteo a produrre estrogeni e progesterone, i quali a loro volta agiscono con un meccanismo a feedback sull'ipotalamo per determinare le variazioni cicliche di produzione di FSH e LH. Mentre il **progesterone** ha un effetto negativo sulla secrezione ipofisaria di gonadotropine, gli **estrogeni** esercitano effetti opposti a seconda della concentrazione: a bassi livelli inibiscono la produzione di gonadotropine, ma superato un valore critico, detto **concentrazione soglia**, ne stimolano il rilascio. È proprio questa duplice azione degli estrogeni che determina le variazioni dei livelli di FSH e LH.

All'inizio della fase follicolare del ciclo ovarico (Fig. 7-14), l'FSH stimola i follicoli antrali a completare la crescita, ma soltanto uno, generalmente quello che per primo raggiunge una dimensione maggiore, inizia a secernere estrogeni. È stato determinato che i livelli inizialmente bassi di questi ormoni, insieme ad una proteina secreta dalle cellule della granulosa detta **inibina**, provocano una diminuzione della secrezione ipofisaria di FSH che scende al disotto della concentrazione necessaria per sostenere lo sviluppo e la sopravvivenza di follicoli antrali meno maturi. Dunque, è attraverso gli

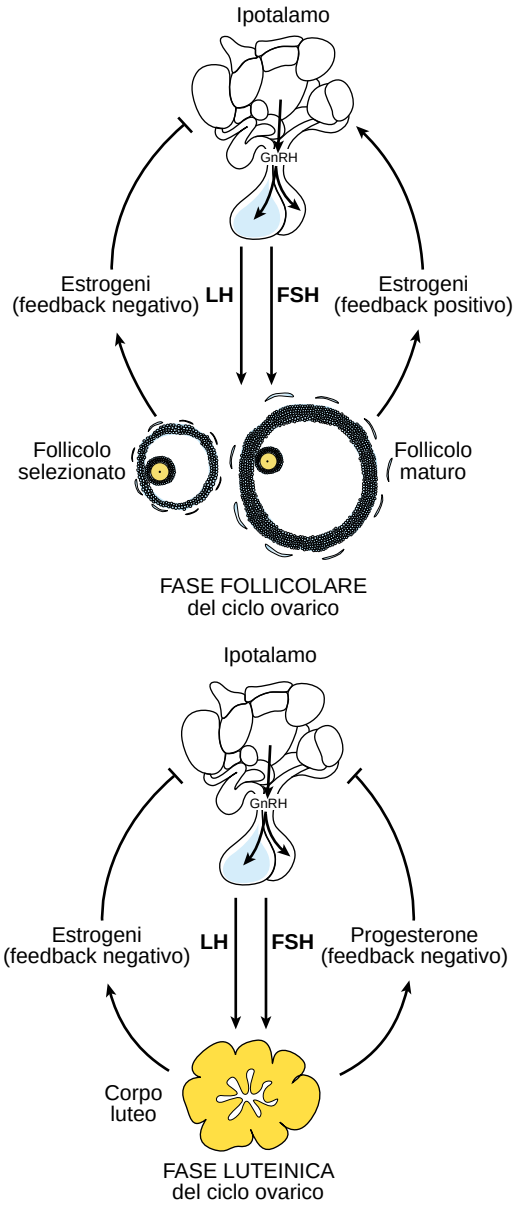



**Figura 7-14** ■ Schema delle interazioni tra ipotalamo, ipofisi e ovaio durante la fase follicolare e la fase luteinica del ciclo ovarico.

estrogeni che lo stesso follicolo destinato a maturare "sopprime" gli altri, riducendo la disponibilità dell'FSH. Difatti, la somministrazione in questa fase del ciclo di FSH o di un inibitore della funzione biologica degli estrogeni, provoca la crescita di più di un follicolo preovulatorio; una pratica questa ampiamente utilizzata nei protocolli di procreazione medicalmente assistita per ottenere un numero sufficiente di ovociti da fecondare *in vitro*. Nella seconda parte della fase follicolare il follicolo dominante produce sempre più estrogeni che, superato il valore ematico di circa 0,2 ng/ml, non esercitano più un'azione inibitoria ma, al contrario, un'azione stimolatoria sull'asse ipotalamo-ipofisario. Si ha così il rilascio massiccio di LH dall'ipofisi che permette al follicolo di completare la sua maturazione. Sotto l'azione dell'LH le cellule della granulosa diminuiscono la sintesi di estrogeni e iniziano a produrre progesterone. Questo processo detto di luteinizzazione inizia già prima dell'ovulazione ma viene completato successivamente con la formazione del corpo luteo. Durante la fase luteinica (Fig. 7-14), l'elevata concentrazione di progesterone, insieme ai livelli bassi ≤0,2 ng/ml) di estrogeni, inibisce la secrezione delle gonadotropine, impedendo che altri follicoli antrali possano crescere e ovulare in questo periodo. Un nuovo ciclo ovarico avrà inizio soltanto dopo la regressione del corpo luteo e la caduta dei livelli di progesterone ed estrogeni, che porterà ad un aumento della secrezione di FSH dall'ipofisi e al reclutamento di un nuovo gruppo di follicoli antrali da selezionare per l'ovulazione.

Nella complessa interazione ipotalamo-ipofisi-gonade si è recentemente inserita una nuova molecola, la **Kisspeptina** (codificata dal gene *Kiss1*). Diverse evidenze sperimentali sugli animali e nuovi approcci terapeutici sull'uomo assegnano infatti un ruolo chiave a questa molecola nella induzione del picco gonadotropico ovulatorio. Questa proteina è prodotta da specifici neuroni ipotalamici a seguito dell'aumento degli estrogeni circolanti secreti dal follicolo dominante e agisce su altri neuroni ipotalamici, che presentano il suo recettore, inducendo la secrezione di GnRH, essenziale per il rilascio di gonadotropine dall'ipofisi. Questa molecola ha anche un'importanza cruciale per l'inizio della pubertà. Infatti, questa tappa fondamentale dello sviluppo riproduttivo non viene raggiunta né nel topo né nell'uomo in presenza di mutazioni inattivanti del gene che codifica per la kisspeptina o per il suo recettore a meno che non venga somministrato il GnRH.

## Le cellule follicolari e la crescita dell'ovocito

Numerosi studi, per la maggior parte effettuati nel topo, hanno portato alla conclusione che le cellule follicolari stimolano la crescita dell'ovocito rilasciando il fattore di crescita **KL** (**kit ligand**) noto anche come SCF (stem cell factor). Questo sistema opera molto probabilmente in tutti i mammiferi poiché in tutte le specie, compresa quella umana, questo fattore di crescita è secreto dalle cellule follicolari e il suo recettore, chiamato Kit (dall'oncogene virale *v-Kit*), è presente sulla membrana dell'ovocito. I cambiamenti metabolici indotti nell'ovocito da KL sono determinati da una serie di fosforilazioni innescate dal suo recettore (Fig. 7-15). È stato dimostrato che il legame di KL al suo recettore permette a quest'ultimo di legare e attivare la fosfoinositide 3 chinasi (PI3K), che dal citoplasma viene reclutata sulla membrana. Qui PI3K fosforila un lipide di membrana, il fosfatidil-inositolo-bifosfato (PIP2) a fosfatidil-inositolo-trifosfato (PIP3), che a sua volta recluta dal citoplasma la chinasi Akt (da un ceppo di topi chiamato AK, da cui fu isolato un virus in grado di provocare una trasformazione [t] tumorale) e il suo attivatore PDK1 (pyruvate dehydrogenase kinase 1). Akt viene così attivata e, agendo su diver-

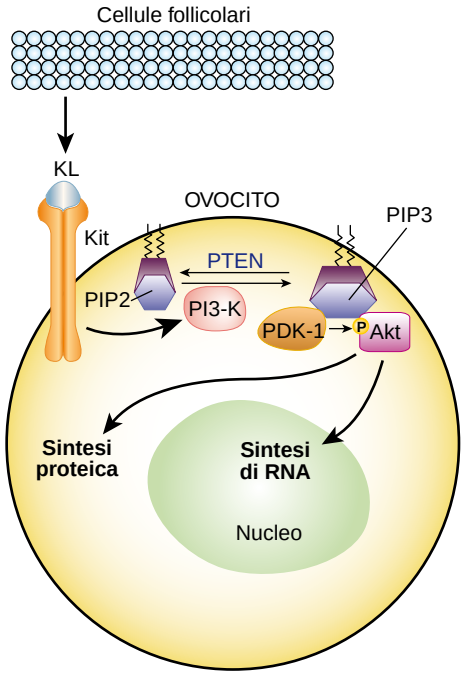



**Figura 7-15** ■ Schema dei meccanismi molecolari attraverso i quali le cellule follicolari stimolano la crescita dell'ovocito.

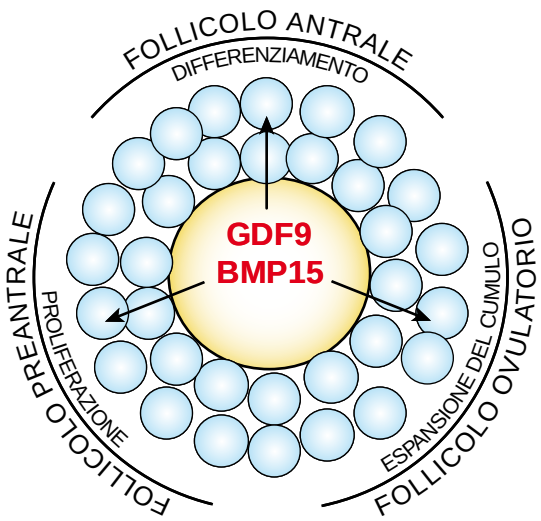



**Figura 7-16** ■ Schema delle funzioni delle cellule follicolari regolate dall'ovocito nei diversi stadi di sviluppo del follicolo.

si substrati, genera una serie di reazioni che portano all'aumento sia della sintesi di mRNA che di proteine. Il ruolo cruciale di Akt nella regolazione della crescita ovocitaria ha trovato conferma in un recente studio eseguito da Liu e collaboratori. Questi ricercatori hanno inattivato, mediante tecniche di ingegneria genetica, il gene che codifica per la fosfatasi PTEN (phosphatase and tensin homolog) negli ovociti di topo. Questo enzima ha un effetto opposto a quello di PI3K sui fosfatidilinositoli di membrana e inibisce l'attivazione di Akt nelle cellule. I risultati hanno mostrato che, in assenza di PTEN, tutti gli ovociti attivano akt e iniziano a crescere pressoché simultaneamente, producendo negli animali una perdita precoce della fertilità per esaurimento della riserva ovocitaria. L'insieme di questi dati porta a pensare che gli ovociti, quando entrano nello stadio di diplotene, esprimano un livello di PTEN che impedisce l'attivazione di Akt e determina il loro stato di "riposo" metabolico; questi possono essere risvegliati e indotti a crescere soltanto allorquando l'attività di PI3K, regolata dalle cellule follicolari mediante KL, sposta l'equilibrio verso l'attivazione di Akt.

## *Il controllo ovocitario della follicologenesi*

È stato dimostrato che gli ovociti, a loro volta, controllano diversi aspetti della follicologenesi attraverso la produzione di fattori di crescita specifici, tra i quali il **GDF9** (growth and differentiation factor 9) e il **BMP15** (bone morphogenetic protein 15) (Fig. 7-16).

Sicuramente questi fattori regolano le prime fasi di sviluppo del follicolo. È stato osservato che i topi sperimentalmente privati del gene che codifica per GDF9 e le pecore portatrici di una mutazione spontanea che inattiva GDF9 o BMP15 sono sterili perché le cellule follicolari non proliferano e i follicoli non sviluppano oltre lo stadio di follicolo primario. Gli ovociti iniziano a crescere ma successivamente, in mancanza di un adeguato supporto della componente somatica, degenerano.

In modo sorprendente, pecore eterozigoti per la mutazione nel gene BMP15, i cui ovociti quindi producono una quantità inferiore di questo fattore, sono più prolifiche del normale, sviluppando più follicoli ovulatori, e di conseguenza andando incontro a gravidanze plurigemellari. Sebbene non sia ancora del tutto chiaro quali meccanismi determinino questo effetto, sembra che un più basso livello di BMP15 renda i follicoli più sensibili alla stimolazione dell'FSH e perciò favorisca la comparsa di recettori per l'LH anche in follicoli antrali non pienamente accresciuti, che vengono quindi stimolati dall'LH ad ovulare. Qualunque sia il meccanismo, è evidente che i fattori ovocitari contribuiscono, insieme all'FSH, alla regolazione del differenziamento delle cellule follicolari e allo sviluppo di un unico follicolo dominante.

GDF9 e BMP15 continuano ad essere espressi anche nel follicolo ovulatorio ma, per effetto della posizione eccentrica dell'ovocito, esercitano la loro azione principalmente sulle cellule più vicine, le cellule del cumulo ooforo. È stato infatti dimostrato nel topo che questi fattori sono necessari per stimolare la sintesi di acido ialuronico e di proteine della matrice mucoelastica del cumulo ooforo, la quale facilita sia l'ovulazione che la fecondazione.

In conclusione, si può affermare che l'ovocito controlla il proprio ambiente assicurandosi che le cellule follicolari crescano e differenzino in modo adeguato a sostenere la sua crescita, maturazione e fecondazione.

Sia GDF9 che BMP15 sono espressi anche negli ovociti umani ed è perciò molto probabile che svolgano funzioni simili nella donna.

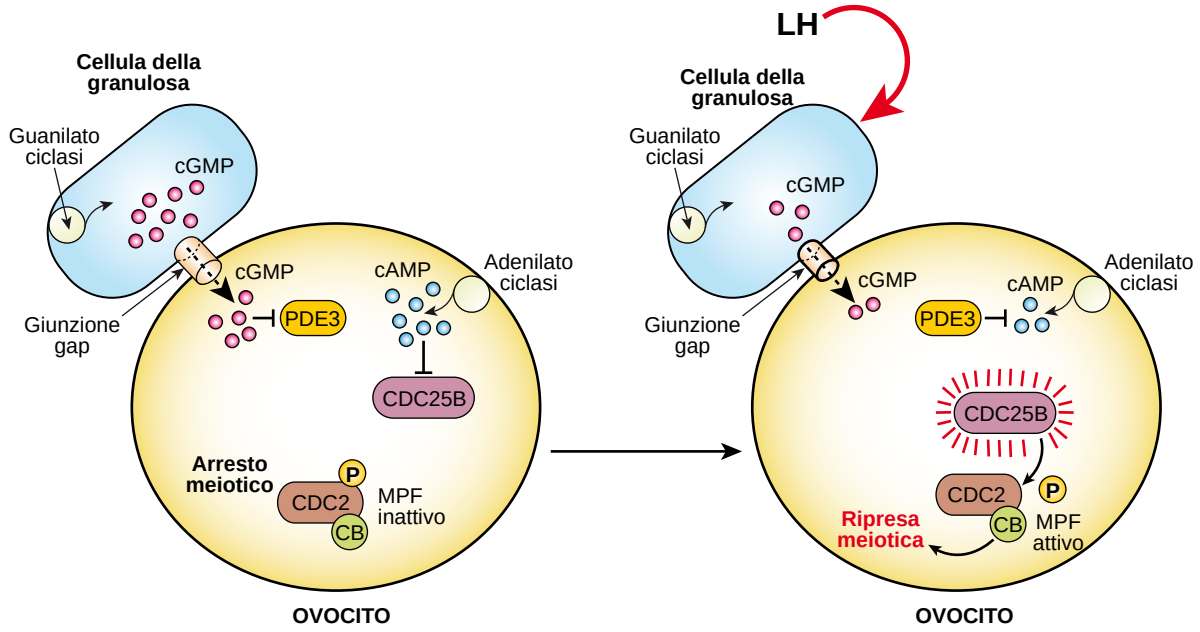



**FIGURA 7-17** ■ Schema del possibile meccanismo d'azione dell'LH e delle cellule follicolari sulla ripresa della maturazione meiotica degli ovociti.

## *La ripresa della meiosi*

I meccanismi che determinano la ripresa della meiosi, stimolata dall'LH poco prima dell'ovulazione, sono soltanto parzialmente noti. Poiché gli ovociti non esprimono recettori per le gonadotropine, è chiaro che questo processo è mediato dalle cellule della granulosa. L'osservazione che gli ovociti, rimossi dai loro follicoli prima del picco preovulatorio di LH, riprendono spontaneamente la meiosi in vitro ha fatto avanzare l'ipotesi che le cellule follicolari esercitino un'influenza inibitoria sulla maturazione dell'ovocito e che il ruolo dell'LH sia di rimuovere tale inibizione. Questa idea ha ricevuto nuovo impulso da alcuni dati recenti. È stato dimostrato che l'uscita dal blocco in diplotene e l'ingresso in metafase I degli ovociti richiede l'attività di un complesso enzimatico, formato dall'associazione della chinasi CDC2 (cell division cycle 2) con la proteina regolativa ciclina B, capace di promuovere l'ingresso in mitosi in tutte le cellule che si dividono, e per questo chiamato **MPF** (mitotic or meiotic promoting factor). Questo enzima fosforila una serie di proteine che portano alla rottura dell'involucro nucleare, alla formazione del fuso e alla condensazione dei cromosomi. L'MPF è sintetizzato durante la fase accrescitiva dell'ovocito, ma è mantenuto inattivo per tutta la durata della fase antrale mediante la fosforilazione di specifici aminoacidi nella chinasi CDC2. Osservazioni condotte su ovociti murini suggeriscono che tale inibizione richieda un adeguato livello di **adenosina monofosfato ciclico** (**cAMP**) nell'ovocito, e che le cellule della granulosa abbiano un ruolo fondamentale in questo trasferendo, attraverso le **giunzioni gap,** la **guanosina monofosfato ciclica (cGMP)** la quale, inibendo la fosfodiesterasi 3 (PDE3), impedisce la degradazione del cAMP. Sembra che l'aumento preovulatorio di LH faccia cessare l'effetto inibitorio delle cellule della granulosa sulla ripresa meiotica dell'ovocito, provocando sia la diminuzione della permeabilità delle giunzioni gap che la riduzione della produzione di cGMP (Fig. 7-17). Questi eventi porterebbero ad un calo del livello di cAMP che, a sua volta, determinerebbe l'attivazione di una fosfatasi, l'enzima **CDC25B** (cell division cycle 25 homolog B) che, defosforilando MPF, lo attiverebbe innescando la ripresa della maturazione meiotica.

## *Formazione del fuso meiotico*

Contrariamente alle cellule somatiche e alle cellule germinali maschili, gli ovociti non hanno centrioli e la formazione del fuso meiotico avviene secondo un processo peculiare. Poco dopo la rottura dell'involucro nucleare compaiono nel citoplasma numerosi centri di organizzazione microtubulare (MTOCs, microtubule organizing centers) dai quali iniziano ad allungarsi i microtubuli. Gli MTOCs progressivamente migrano verso i cromosomi e qui i microtubuli vengono organizzati in un orientamento bipolare. L'osservazione che in frammenti citoplasmatici di ovociti privi di cromosomi si formino fusi multipli, e di grandezza variabile, indica che i cromosomi sono necessari non tanto per polarizzare i microtubuli, ma per formare un fuso unico e limitarne la grandezza. È stato ipotizzato che questa azione possa essere dovuta alla concentrazione e attivazione, in prossimità dei cromosomi, di fattori che stabilizzano i microtubuli.

## ASPETTI CLINICI

### Individuazione del periodo fertile

È frequente che la durata del ciclo ovarico nelle donne sia irregolare o, comunque, diversa da quella indicativa di 28 giorni. Mentre infatti il periodo che intercorre tra l'ovulazione e la successiva mestruazione è costante e di 14 giorni, l'intervallo tra una mestruazione e la successiva ovulazione è variabile, in quanto lo sviluppo e la maturazione del follicolo possono essere influenzati da diversi fattori. Alcuni metodi naturali possono aiutare ad individuare il periodo fertile. Ad esempio l'aumento della secrezione e della fluidità del muco cervicale determinato dagli estrogeni indica l'approssimarsi dell'ovulazione, mentre un aumento della temperatura corporea di circa 0,3-0,5 °C, determinato dal progesterone, suggerisce che l'ovulazione sia già avvenuta. In ultimo, un calcolo probabilistico del periodo fertile può essere determinato attraverso il **metodo Ogino-Knaus**, sviluppato nel 1924 dal medico giapponese Kyusako Ogino, e perfezionato dal medico austriaco Hermann Knaus nel 1928. In base a questo metodo, il probabile periodo fecondo si ottiene sottraendo 18 al ciclo ovarico più breve intercorso nell'anno e 11 a quello più lungo. Questi metodi naturali si sono dimostrati poco affidabili per prevenire la gravidanza, ma possono essere di qualche aiuto in tutti quei casi in cui una coppia desideri aumentare le probabilità di concepire.

### Inibizione dell'ovulazione

Come abbiamo visto nei paragrafi precedenti, il progesterone e gli estrogeni esercitano un'azione inibitoria sulla produzione di gonadotropine da parte dell'ipofisi durante la fase luteinica del ciclo ovarico e durante la gravidanza, impedendo il completamento dello sviluppo follicolare e di conseguenza l'ovulazione. Su questo principio si basa l'impiego di preparati ormonali come **agenti contraccettivi** per via orale (pillola) o per assorbimento cutaneo (cerotto). I preparati antiovulatori impiegati ai fini contraccettivi contengono uno dei vari composti progestinici e piccole quantità di estrogeni capaci di impedire la maturazione mensile del follicolo. L'interruzione della somministrazione di questi composti al 25° giorno del ciclo assicura un normale flusso mestruale.

### Età della donna e fertilità

La probabilità per una donna di concepire e di portare a termine una gravidanza diminuisce sensibilmente con l'età, un fenomeno noto come **invecchiamento riproduttivo femminile**. Studi effettuati su donne sottoposte per sterilità del partner ad inseminazione artificiale suggeriscono che la probabilità di concepire per ogni ciclo ovarico diminuisca a partire dai 31 anni di circa il 12% ogni anno (Fig. 7-18). Questo fenomeno non dipende da cambiamenti della funzionalità dell'utero ma dalla diminuzione della qualità degli ovociti, probabilmente per un aumento delle non-disgiunzioni meiotiche. A questa conclusione si è giunti attraverso un'analisi statistica effettuata su vasta scala dei risultati ottenuti nelle FIVET (fecondazioni in vitro e embryo-transfer) con ovodonazione. È infatti risultato che il successo riproduttivo (in termini di nascite) è elevato se gli ovociti utilizzati per la FIVET sono stati donati da una donna giovane (di 20-30 anni), qualsiasi sia l'età della donna ricevente. Il successo riproduttivo diminuisce invece progressivamente con l'età se vengono usati i propri ovociti (Fig. 7-19).

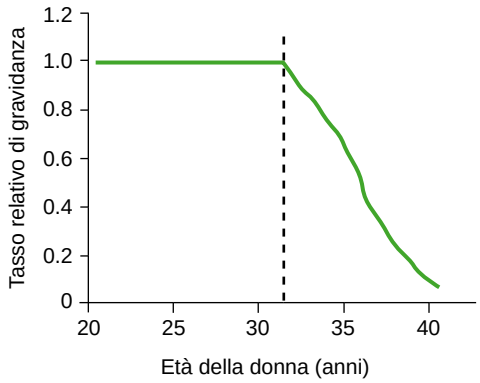



**Figura 7-18** ■ Il grafico mostra che la fecondità della donna diminuisce progressivamente dopo i 31 anni.

### Menopausa precoce

Studi statistici hanno dimostrato che circa 1 donna su 100 entra in menopausa precocemente, tra i 30 e i 40 anni, una sindrome nota come **Premature Ovarian Failure** (POF). La POF è dovuta ad un'accelerazione del processo di apoptosi o atresia follicolare, soprattutto a carico dei follicoli primordiali, determinato da trattamenti te-

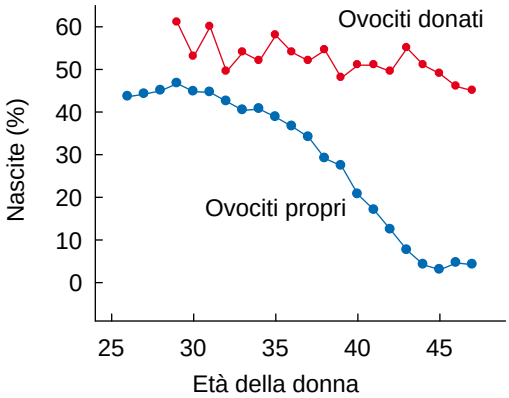



**Figura 7-19** ■ Il grafico mostra la percentuale di successo in termini di bambini nati per ciclo di FIVET in funzione dell'età della donna, utilizzando ovociti propri (in blu) o ovociti donati da donne più giovani (in rosso).

**TABELLA 7-1**
Origine, frequenza e distribuzione per età dei tumori ovarici

| Origine della neoplasia | Epitelio di superficie | Cellule germinali | Cordoni sessuali – Stroma |
|---|---|---|---|
| **Frequenza** | 65-70% | 15-20% | 5-10% |
| **Percentuale di neoplasie maligne** | 90% | 3-5% | 2-3% |
| **Gruppo di età colpito** | >20 anni | 0-25 anni | Tutte |
| **Tipo** | ■ Tumore sieroso<br>■ Tumore mucinoso<br>■ Tumore endometriale<br>■ Tumore cellule chiare<br>■ Tumore di Brenner | ■ Teratoma<br>■ Disgerminoma<br>■ Coriocarcinoma | ■ Fibroma<br>■ Tumore a cellule della granulosa<br>■ Tumore a cellule di Sertoli-Leydig |

rapeutici, o da alterazioni genetiche o immunitarie o da condizioni ambientali. Ad esempio, la POF è una conseguenza frequente dell'esposizione delle ovaie all'irraggiamento o a sostanze chemioterapiche usate per la terapia dei tumori o delle malattie autoimmuni come l'artrite reumatoide. L'avanzamento delle conoscenze dei processi molecolari che regolano la sopravvivenza e lo sviluppo dei follicoli, e la sperimentazione su animali di laboratorio hanno permesso di sviluppare diverse strategie, ancora in fase di perfezionamento, per proteggere o ripristinare la fertilità in queste pazienti. Ad esempio, prima di un trattamento antitumorale, è possibile prelevare e fecondare in vitro gli ovociti. Gli embrioni generati possono essere congelati e trapiantati in utero successivamente alla risoluzione della patologia (vedi Capitolo 8). Questo approccio tuttavia può creare problemi etici e non è praticabile in assenza di un partner o quando la malattia richieda un intervento immediato. Una valida alternativa è quella di congelare un frammento di ovaio, che può essere ritrapiantato nella donna una volta superata la malattia. Questa tecnica è stata applicata la prima volta con successo nel 2004 da Donnez e coll. in una paziente affetta da linfoma di Hodgkin. Questo approccio tuttavia non è praticabile in tutti i casi, come ad esempio nelle donne con tumori maligni metastatizzanti o ovarici, poiché cellule maligne possono essere presenti nel tessuto trapiantato e trasmesse di nuovo alla paziente. Due nuovi approcci sperimentali sono in fase di studio: la crescita e maturazione degli ovociti in vitro e l'utilizzo di sostanze antiapoptotiche durante i trattamenti terapeutici per prevenire il depauperamento dei follicoli primordiali.

Nelle donne in cui la POF ha un'origine non farmacologica, ad esempio genetica o ambientale, spesso questa sindrome viene diagnosticata quando ormai l'ovaio è già privo di ovociti. Tuttavia, in alcuni casi alcuni follicoli sono ancora presenti nell'ovaio ma è impossibile prevedere se e quando riprenderanno a maturare. La scoperta di Liu e collaboratori (descritta sopra), che basta inattivare PTEN nei topi per indurre i follicoli primordiali a crescere, apre nuove prospettive. Infatti, il trattamento di queste donne con un inibitore dell'attività enzimatica di PTEN potrebbe probabilmente promuovere la maturazione dei follicoli residui e aiutare queste giovani donne ad avere figli.

## *I tumori ovarici*

I tumori dell'ovaio rappresentano nel mondo occidentale circa il 5% di tutti i tumori femminili. Essi sono per l'80% benigni. Esiste una grande varietà di tumori ovarici che vengono classificati in tre tipi principali in funzione della loro origine cellulare: tumori epiteliali, tumori germinali e tumori stromali (Tab. 7-1).

I **tumori epiteliali** costituiscono circa il 90% dei tumori ovarici maligni (carcinomi) e la loro frequenza aumenta con l'aumentare dell'età raggiungendo un picco tra i 50 ed i 69 anni. Si ritiene che questi tumori originino dall'epitelio che riveste la superficie dell'ovaio. Esso, come gli epiteli delle vie genitali, deriva dall'epitelio celomatico (vedi Capitolo 16) e, durante la carcinogenesi, assume caratteristiche morfologiche e funzionali simili agli epiteli delle tube uterine, dell'endometrio e dell'endocervice, probabilmente ripercorrendo tappe differenziative dei diversi percorsi embriologici. Tuttavia, studi più recenti suggeriscono che alcuni di questi tumori possano anche originare da cellule delle vie genitali. Infatti, negli ultimi anni è stata raccolta una serie di evidenze a favore dell'ipotesi che molti dei tumori epiteliali di tipo sieroso, con un elevato grado di malignità, potrebbero derivare dalle cellule epiteliali delle fimbrie tubariche.

I **tumori germinali** sono pressoché esclusivi dell'età giovanile (infanzia e adolescenza). Essi sono per la maggior parte benigni e rappresentano solo il 3-5 per cento delle neoplasie ovariche maligne. Questi includono i teratomi, che esibiscono caratteristiche istologiche uniche tra i tumori, essendo formati da tessuti che originano da tutti e tre i foglietti embrionali. In essi infatti possiamo trovare addirittura strutture complesse, come capelli e denti. Sebbene l'origine di questi tumori non sia ancora del tutto chiara, l'ipotesi più accreditata è che sviluppino da ovociti sfuggiti al blocco meiotico e attivati per via partenogenetica all'interno del follicolo. Infatti molti teratomi, contrariamente ai tessuti normali dell'ospite, sono omozigoti per i polimorfismi studiati, suggerendo che il loro genotipo è acquisito a seguito di una divisione meiotica. Inoltre, è stato dimostrato che topi del ceppo LT/Sv con alterata attività di MOS e topi sperimentalmente privati del gene MOS che, come vedremo nel Capitolo 8, è responsabile del blocco meiotico degli ovociti in metafase II, sviluppano teratomi ovarici con una

frequenza molto elevata correlata proprio al grado di attivazione partenogenetica spontanea degli ovociti.

I **tumori stromali** sono caratterizzati da una bassa aggressività e rappresentano il 4% circa delle neoplasie ovariche maligne. Tra quelli che originano dai cordoni sessuali della gonade embrionale troviamo: i tumori a cellule della granulosa che, avendo la capacità di secernere grandi quantità di estrogeni, alterano la struttura dell'utero quando insorgono in età feconda e in menopausa, e accelerano la pubertà quando sviluppano in età adolescenziale; i tumori a cellule di Sertoli-Leydig che sono tumori virilizzanti in quanto producono testosterone; infine, i fibromi, tumori rari che originano dal connettivo ovarico.

Purtroppo la maggior parte dei tumori ovarici sono asintomatici fino a che non raggiungono dimensioni notevoli. A causa proprio della tardività della sintomatologia e della loro aggressività si pongono tra i primi posti nella mortalità per neoplasie ginecologiche.

I fattori di rischio per il cancro dell'ovaio, oltre l'età avanzata, possono essere di tipo endocrino, non aver avuto figli (nulliparità) o essersi sottoposte a terapia ormonale per indurre l'ovulazione. Al contrario, un alto numero di gravidanze, l'allattamento al seno e l'uso a lungo termine di contraccettivi estroprogestinici diminuiscono il rischio. Anche fattori ambientali e abitudini alimentari con dieta ricca di grassi sembrano correlati al maggior rischio. Infine, il 7-10% di tutti i casi presenta una familiarità ed è il risultato di difetti genetici consistenti nella mutazione di due geni deputati al riparo del DNA danneggiato, Brca-1 (breast cancer type 1 susceptibility protein) e Brca-2, anche responsabili dell'insorgenza del carcinoma mammario.

## Bibliografia citata nel testo e letture consigliate

Broekmans J e coll. Female reproductive ageing: current knowledge and future trends. Trends in Endocrinology and Metabolism 18, 58-65, 2007.

Dekel N. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. Molecular and Cellular Endocrinology 234, 19-25, 2005.

Dong J e coll. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. Nature 383, 531-535, 1996.

Donnez O e coll. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. Lancet 364, 1405-1410, 2004.

Georgescu ES e coll. Present and future fertility preservation strategies for female cancer patients. Obsterical and Gynecological Survey 63, 725-732, 2008.

Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. Human Reproduction 1, 81-87, 1986.

Lincoln AJ. e coll. Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. Nature Genetics 30, 446-449, 2002.

Liu K e coll. Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: new roles for an old timer. Developmental Biology 299, 1-11, 2006.

McNatty KP e coll. Oocyte-expressed genes affecting ovulation rate. Molecular and Cellular Endocrinology 234, 57-66, 2005.

Oktay K e coll. Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. Lancet 363, 837-840, 2004.

Oktay K, Sönmezer M. Chemotherapy and amenorrhea: risks and treatment options. Current Opinions in Obstetrics and Gynecology 20, 408-415, 2008.

Reddy P e coll. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. Science 319, 611-615, 2008.

Russell DL, Salustri A. Extracellular matrix of the cumulus-oocyte complex. Seminar in Reproductive Medicine 24, 217-227, 2006.

Salustri A e coll. Mouse oocytes regulate hyaluronic acid synthesis and mucification by FSH-stimulated cumulus cells. Developmental Biology 138, 26-32, 1990.

8

# La fecondazione

Massimo De Felici

Dal punto di vista biologico la fecondazione è un complesso processo d'interazione tra due cellule estremamente specializzate, lo spermatozoo e l'ovocito, che è alla base della riproduzione sessuale. Con la penetrazione dello spermatozoo nel citoplasma dell'ovocito, si ristabilisce il corredo diploide di 46 cromosomi ed inizia lo sviluppo dell'embrione (Fig. 8-1).

VIDEO 1 La fecondazione ha inizio quando gli spermatozoi sono deposti nella vagina della donna e termina con la formazione dell'ovocito fecondato.

## PASSAGGIO DEGLI SPERMATOZOI ATTRAVERSO LE VIE GENITALI MASCHILI E FEMMINILI

Quando gli spermatozoi vengono rilasciati nel lume dei tubuli seminiferi del testicolo, non sono ancora in grado di fecondare l'ovocito. Essi lo diventano durante il passaggio lungo le vie genitali maschili (rete testis, condottini efferenti, epididimo e dotto deferente, Fig. 8-2) e femminili (vagina, utero, ovidutti) a seguito di processi maturativi e di capacitazione ancora non completamente chiariti. Tra i processi maturativi che avvengono durante il transito nelle vie genitali maschili, è particolarmente importante l'acquisizione della motilità del flagello che avviene nell'epididimo, un tubulo molto convoluto lungo tra 4 e i 7 m (vedi Capitolo 6). Il tempo stimato del transito nell'epididimo è piuttosto variabile, da 2 giorni a circa una settimana. L'epididimo riassorbe, grazie al suo epitelio di rivestimento con sterociglia, ioni e acqua dal fluido testicolare, in cui sono immersi gli spermatozoi, concentrandoli. Inoltre esso produce un lipide (la glicerofosfocolina) e altre molecole non ancora identificate necessarie probabilmente sia alla sopravvi-

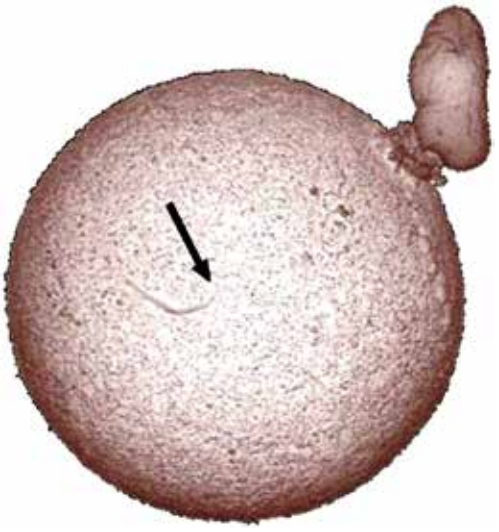


**Figura 8-1** Un ovocito di topo privato della zona pellucida appena fecondato. Notare (freccia), alla superficie dell'ovocito, la coda di uno spermatozoo appena penetrato al suo interno. (Fotografia di M. De Felici)

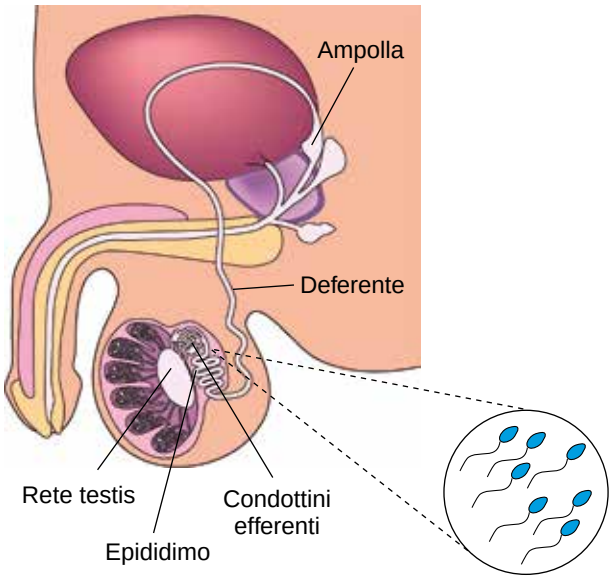



**Figura 8-2** Vie genitali maschili. Gli spermatozoi acquisiscono la motilità nell'epididimo.

venza che alla maturazione degli spermatozoi (vedi anche Capitolo 6). Gli spermatozoi maturi si accumulano nel tratto terminale dell'epididimo chiamato coda, nel deferente e soprattutto nella regione terminale rigonfia di questo chiamata **ampolla deferenziale**.

Essi si trovano progressivamente immersi in un liquido viscoso il **plasma** o **liquido seminale** prodotto dalle cellule epiteliali delle vie genitali e dalle ghiandole annesse (vescichette seminali, prostata, ghiandole bulbouretrali o di Cowper). Il plasma seminale contiene molecole di varia natura chimica (zuccheri, lipidi, proteine, ioni e ormoni) che hanno la funzione di agevolare il movimento degli spermatozoi, di proteggerli e di nutrirli. Gli spermatozoi e il plasma seminale formano il **seme** o **sperma**. Al momento dell'emissione del seme (eiaculazione), le ghiandole delle vie genitali, in particolare la prostata, si contraggono ed espellono una notevole quantità di secreto. Il liquido seminale emesso in un'eiaculazione varia da 1 a 5 ml e contiene di norma tra 50-100 milioni di spermatozoi per ml.

Appena il seme è deposto nella vagina della donna, gli spermatozoi iniziano a risalire le vie genitali femminili per raggiungere l'ovocito (Fig. 8-3). Questo, a seguito dell'ovulazione, si trova in una regione delle tube uterine (o di Fallopio o ovidutti) chiamata **ampolla tubarica**. Per risalire verso l'ovocito gli spermatozoi seguono un percorso obbligato di circa 20 cm (canale vaginale, utero, tuba) (Fig. 8-3); alcuni lo compiono in pochi minuti, altri impiegano alcune ore o addirittura giorni. La loro progressione verso l'ovocito è dovuta in minima parte al movimento del flagello, ma soprattutto alla contrazione della muscolatura liscia delle pareti delle vie genitali femminili. Dei diversi milioni di spermatozoi deposti nella vagina soltanto poche centinaia riescono a raggiungere vivi l'ampolla: la maggior parte di essi muore nel giro di poche ore prima di arrivare nei pressi dell'ovocito o si perdono nella cavità peritoneale. È tuttavia dimostrato che alcuni spermatozoi possono rimanere vitali e in grado di fecondare fino a cinque giorni nelle pieghe della mucosa, in particolare nella regione che collega la tuba al corpo dell'utero chiamata **istmo tubarico**. Subito dopo l'emissione, gli spermatozoi, anche se maturi, hanno una bassa capacità di fecondazione. Questa è acquisita durante la permanenza nelle vie genitali femminili e tale fenomeno è chiamato **capacitazione**.

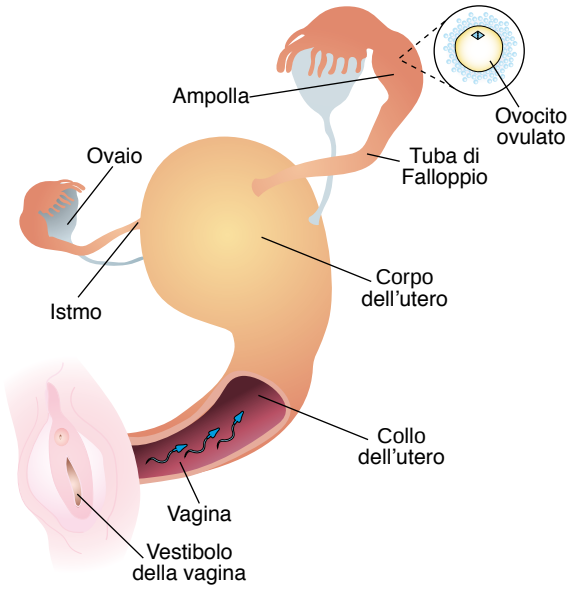



**Figura 8-3** ■ Spermatozoi nelle vie genitali femminili e ovocito ovulato circondato da cellule del cumulo ooforo nell'ampolla della tuba uterina.

## INTERAZIONI RAVVICINATE SPERMATOZOO-OVOCITO

Gli spermatozoi giunti nell'ampolla tubarica devono superare diverse strutture che circondano l'ovocito prima di poter penetrare al suo interno. Normalmente solo uno spermatozoo entra nell'ovocito, ma alcune decine possono arrivare contemporaneamente nei pressi e interagire con i rivestimenti dell'ovocito (Fig. 8-4). Il primo rivestimento che gli spermatozoi devono attraversare sono le cellule del **cumulo ooforo** che circondano l'ovocito ovulato. Si tratta di alcune migliaia di cellule follicolari rimaste a circondare l'ovocito e che sono immerse in una matrice gelatinosa formata prevalentemente da acido ialuronico (un glicosoaminoglicano tipico della sostanza intercellulare dei tessuti connettivi). Gli spermatozoi attraversano questa matrice mediante il movimento del flagello e forse servendosi dell'enzima ialuronidasi che degrada l'acido ialuronico. Essi si legano quindi alla **zona pellucida,** una matrice glicoproteica spessa circa 20 µm, che circonda l'ovocito (vedi paragrafo "Processi e molecole"). Durante l'attraversamento del cumulo ooforo e/o dopo il legame alla zona, gli spermatozoi vanno incontro alla **reazione acrosomiale** (AR, acrosome reaction) (Fig. 8-5). Questa consiste nella fusione in più punti della membrana acrosomiale esterna con la soprastante regione della membrana plasmatica che riveste la testa dello spermatozoo. A seguito di questa reazione, la struttura della testa dello spermatozoo si modica notevolmente. La membrana plasmatica, che riveste anteriormente la testa dello spermatozoo, viene perduta insieme all'acrosoma; la testa dello spermatozoo è ora delimitata anteriormente dalla membrana acrosomiale interna che si continua con la regione equatoriale della membrana plasmatica; al di sotto di questa si organizzano filamenti del citoscheletro (**lamina postacrosomiale**). Durante l'AR, lo spermatozoo rilascia enzimi solubili contenuti nell'acrosoma e ne espone altri sulla membrana acrosomiale interna. Grazie a questi enzimi, lo spermatozoo digerisce localmente le glicoproteine della zona procurandosi un passaggio verso l'ovocito; l'attraversamento della zona avviene grazie al movimento del flagello.

Attraversata la zona pellucida, lo spermatozoo è catturato dai microvilli dell'ovolemma dell'ovocito e aderisce tangenzialmente all'ovocito, a livello della regione equatoriale della membrana plasmatica, all'ovolemma

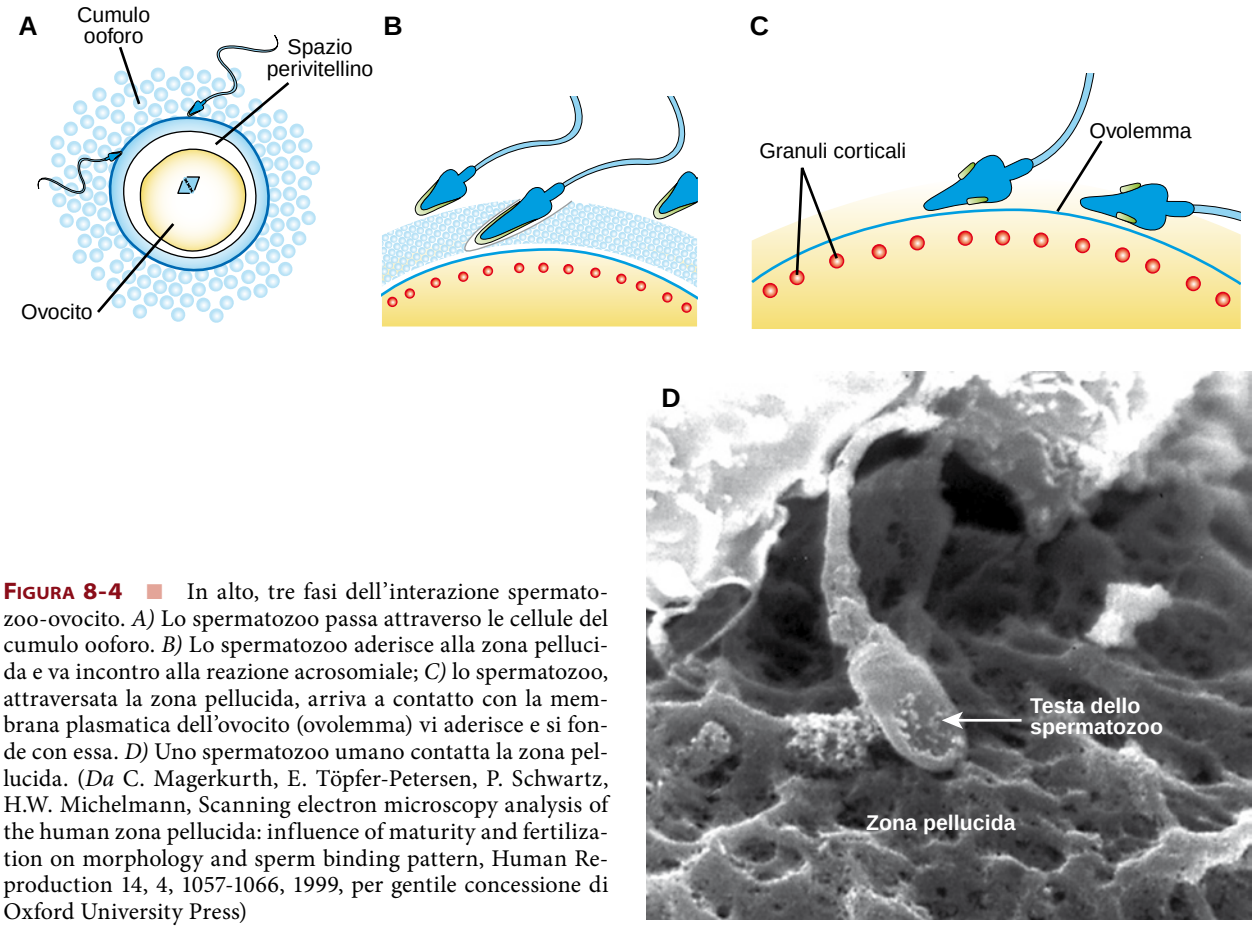



**Figura 8-4** ■ In alto, tre fasi dell'interazione spermatozoo-ovocito. *A)* Lo spermatozoo passa attraverso le cellule del cumulo ooforo. *B)* Lo spermatozoo aderisce alla zona pellucida e va incontro alla reazione acrosomiale; *C)* lo spermatozoo, attraversata la zona pellucida, arriva a contatto con la membrana plasmatica dell'ovocito (ovolemma) vi aderisce e si fonde con essa. *D)* Uno spermatozoo umano contatta la zona pellucida. (*Da* C. Magerkurth, E. Töpfer-Petersen, P. Schwartz, H.W. Michelmann, Scanning electron microscopy analysis of the human zona pellucida: influence of maturity and fertilization on morphology and sperm binding pattern, Human Reproduction 14, 4, 1057-1066, 1999, per gentile concessione di Oxford University Press)

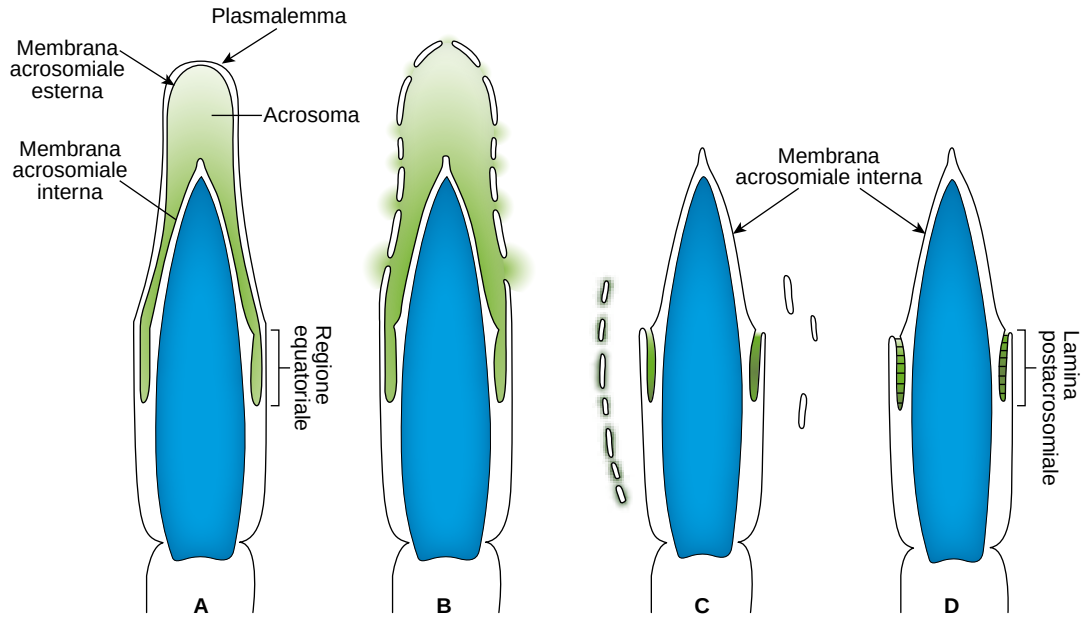



**Figura 8-5** ■ Reazione acrosomiale dello spermatozoo. *A)* Spermatozoo intatto, munito di tipico cappuccio dell'acrosoma. *B)* Reazione acrosomiale in atto, come osservata al microscopio elettronico. *C,D)* Fusione e vescicolazione tra membrana plasmatica e membrana acrosomica esterna. Al di sotto della regione equatoriale del plasmolemma si organizza la lamina postacrosomiale.

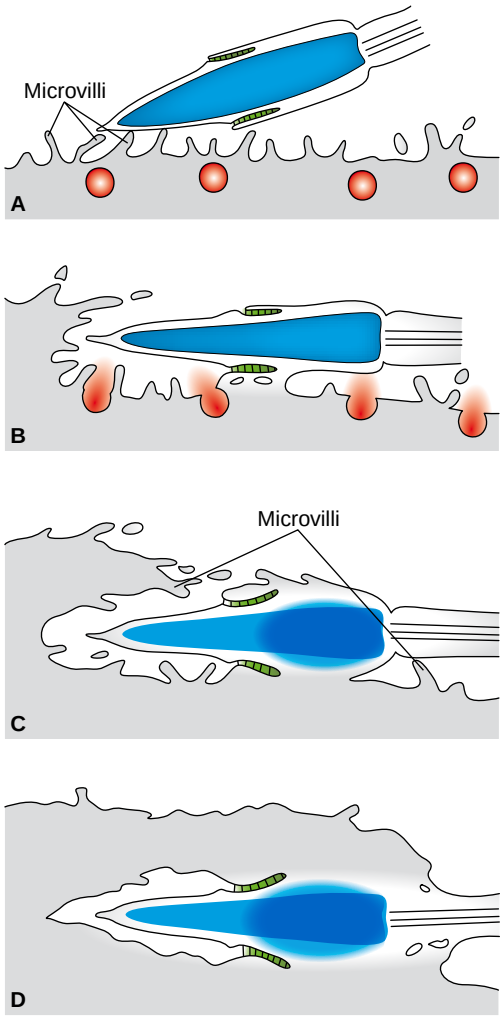



**Figura 8-6** ■ Lo schema indica le fasi di legame e di adesione dello spermatozoo all'ovolemma dell'ovocito. Notare i microvilli che catturano lo spermatozoo.

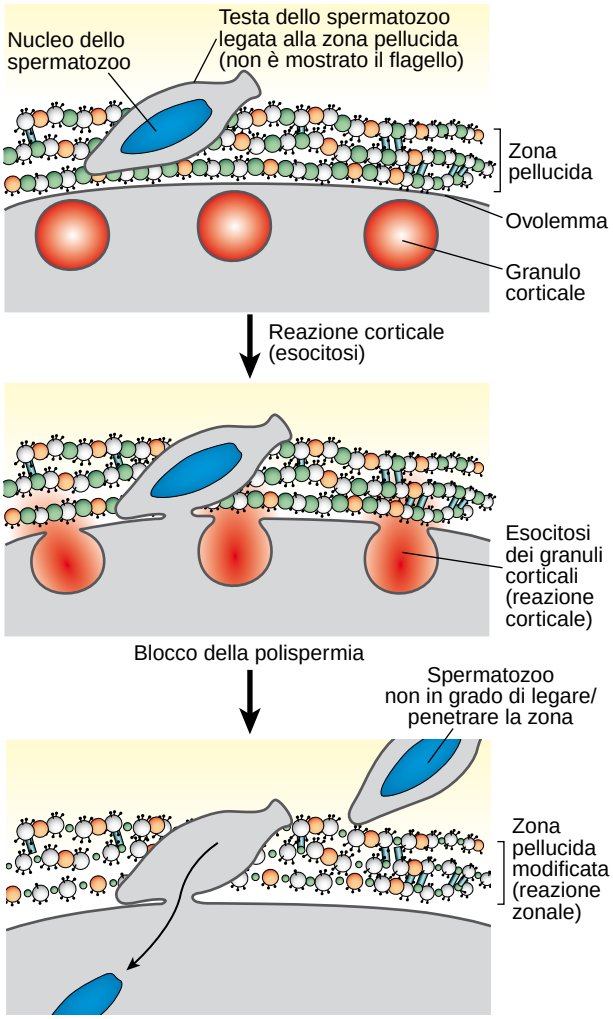



**Figura 8-7** ■ Fasi della reazione corticale e zonale in un ovocito fecondato.

dell'ovocito (Fig. 8-6). Nel giro di pochi secondi le due membrane si fondono e immediatamente il flagello dello spermatozoo cessa di muoversi. Queste fasi della fecondazione, dall'attraversamento del cumulo ooforo alla fusione, durano all'incirca 10-20 min.

## ATTIVAZIONE DELL'OVOCITO

Subito dopo la fusione, l'ovolemma con il sottostante citoplasma dell'ovocito si solleva per inglobare lo spermatozoo. Insieme al nucleo dello spermatozoo sono incorporati nel citoplasma dell'ovocito alcune componenti del flagello, quali i mitocondri e il centriolo prossimale. Mentre in altri mammiferi i mitocondri dello spermatozoo vengono eliminati nel citoplasma dell'ovocito (i mitocondri dell'embrione sono d'origine materna), nell'uomo il centriolo dello spermatozoo permane e sembra possa avere un ruolo nell'organizzazione del fuso della prima divisione mitotica dello zigote (si ricordi che l'ovocito è privo di centrioli).

La fusione è seguita da rapidi eventi molecolari che fanno parte del processo chiamato **attivazione dell'ovocito**. Due degli eventi più rapidi che si verificano nell'ovocito sono l'**iperpolarizzazione dell'ovolemma** e l'**aumento della concentrazione di ioni $Ca^{2+}$** nel citoplasma (vedi "Processi e molecole"). Entro pochi minuti si verifica quindi l'esocitosi dei granuli corticali (**reazione corticale**) e modificazioni della zona pellucida (**reazione zonale**). L'iperpolarizzazione diminuisce la capacità dell'ovolemma di legare e fondersi con altri spermatozoi. Allo stesso tempo molecole rilasciate dai granuli corticali modificano la zona pellucida rendendola incapace di legare altri spermatozoi e impenetrabile (questa seconda modificazione sembra particolarmente importante nella specie umana) da parte di quelli che già vi si trovino legati (Fig. 8-7). Questi fenomeni impediscono la

**polispermia**, ovvero la possibilità che più di uno spermatozoo possa penetrare nell'ovocito, evento che porterebbe inevitabilmente alla degenerazione dell'embrione. Entro 2-4 ore dalla fecondazione, nel citoplasma dell'ovocito vengono disattivati i meccanismi molecolari che lo tenevano bloccato in metafase II (in particolare il complesso chiamato **fattore promuovente la meiosi** (meiotic promoting factor, **MPF**, vedi paragrafo "Processi e molecole"), e attivati complessi enzimatici che fanno completare la meiosi dell'ovocito con l'anafase II e la telofase II. Questa termina con l'emissione del secondo globulo polare. Allo stesso tempo la cromatina dello spermatozoo viene decondensata da fattori presenti nel citoplasma dell'ovocito. Dopo 4-7 ore, intorno a ciascun corredo aploide di cromatina, si organizza un involucro nucleare. Si formano così due nuclei chiamati **pronuclei** (il maschile è generalmente più grande del femminile) (Fig. 8-8). Un ovocito che è stato fecondato da uno spermatozoo e ha emesso il secondo globulo polare, ma presenta i corredi cromosomici materno e paterno ancora separati è chiamato da alcuni autori **ootide**. In questo stadio non si sono ancora verificati la duplicazione del DNA e l'unione dei cromosomi materni e paterni sulla piastra metafasica, eventi che denotano la formazione dello **zigote**, considerato la prima cellula dell'embrione. Nello stadio di ootide i due pronuclei lentamente si portano nella regione centrale del citoplasma e si avvicinano. Nel giro di poche ore ciascun corredo aploide duplica il DNA in preparazione della prima divisione mitotica. La cromatina quindi si condensa (separatamente nei due pronuclei) in 23 cromosomi materni e 23 paterni, gli involucri nucleari si dissolvono, si forma il fuso mitotico e i cromosomi si portano all'equatore. Lo zigote è ora formato e la fase finale della fecondazione è terminata.

## PROCESSI E MOLECOLE

### *La capacitazione dello spermatozoo*

Sebbene i meccanismi molecolari della capacitazione dello spermatozoo non siano stati del tutto chiariti, sembra che tale processo comporti una fluidificazione della membrana plasmatica attraverso la **rimozione di colesterolo** dalla membrana e la fosforilazione di alcuni substrati da parte della chinasi **PKA** (protein kinase cAMP-dependent). Questi cambiamenti attivano un'ipermotilità nello spermatozoo e lo rendono in grado, ovvero "capace", di andare incontro alla reazione acrosomiale descritta nella precedente sezione. Anche cambiamenti nei sistemi di regolazione della concentrazione di $Ca^{2+}$ nel citoplasma, forse controllati dal progesterone, ormone secreto dal corpo luteo della donna dopo l'ovulazione, si accompagnano a tale processo. Una conseguenza della capacitazione sembra essere anche l'acquisizione da parte dello spermatozoo della capacità di legarsi alla zona pellucida.

Anche se la capacitazione avviene normalmente nelle vie genitali femminili, nelle tecniche di fecondazione in vitro, gli spermatozoi sono capacitati mediante semplici lavaggi in un appropriato terreno di coltura e/o una permanenza d'alcune ore in tale terreno. Gli studi sulla capacitazione in vitro hanno consentito di dimostrare che lo ione $HCO_3^-$ gioca un ruolo essenziale in questo fenomeno, avendo la funzione di attivare una adenililato ciclasi solubile atipica, di cui gli spermatozoi sono ricchi, che non è regolata come di norma dalla proteina G, ma dallo ione bicarbonato. Lo ione $HCO_3^-$ penetra nello spermatozoo attraverso il canale anionico CTFR (inizialmente descritto come canale per il $Cl^-$). All'attivazione della ciclasi fa seguito la produzione di cAMP e, a cascata, l'attivazione della PKA e un aumento della fosforila-

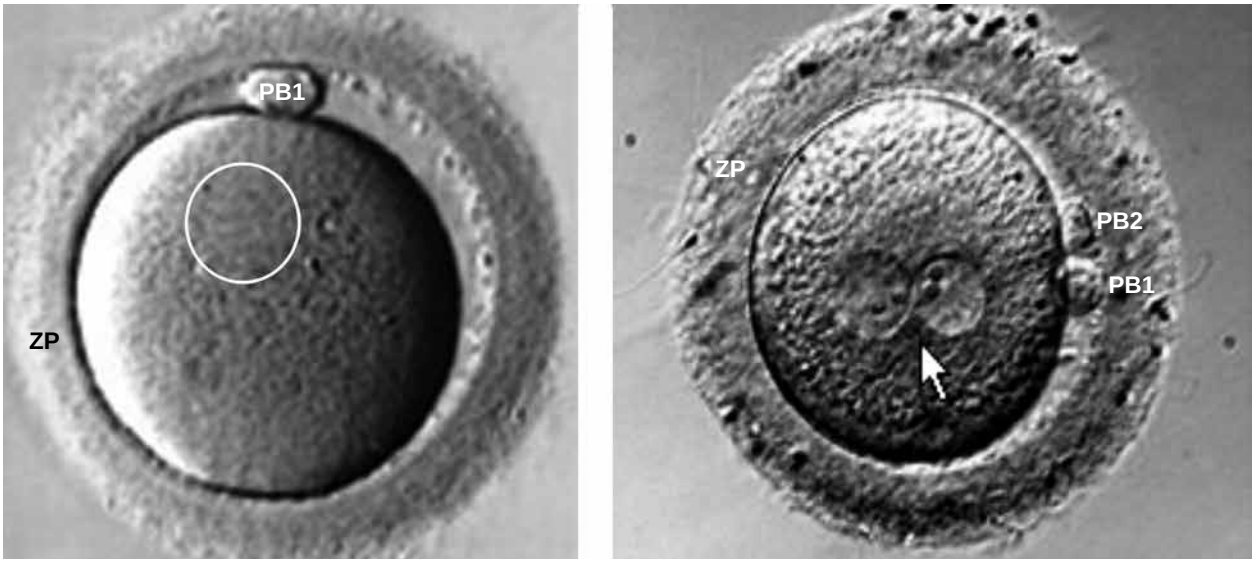



**Figura 8-8** ■ Un ovocito prima *(A)* e dopo la fecondazione *(B)*. Il cerchio in *A* indica l'area del fuso metafasico II, in *B* notare i due pronuclei (freccia), il pronucleo maschile è quello di maggiore dimensione (a sinistra). PB1 e PB2 = globulo polare 1 e 2; ZP = zona pellucida.

zione di varie proteine dello spermatozoo. Anche lo ione $Ca^{2+}$ (essenziale per l'iperattivazione) e un accettore di colesterolo (albumina sierica) sono indispensabili per ottenere la capacitazione in vitro.

Va qui ricordato che la scoperta che gli spermatozoi potevano essere capacitati anche fuori delle vie genitali femminili ha aperto la strada alle tecniche di fecondazione in vitro (vedi paragrafo "Aspetti clinici").

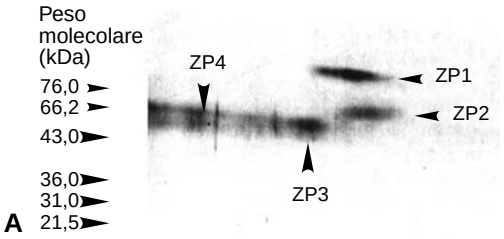
## Chemiotassi e termotassi

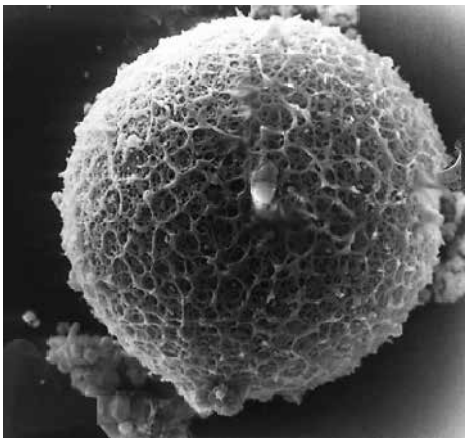
Uno degli aspetti ancora poco chiariti della fecondazione è come gli spermatozoi riescano a raggiungere l'ovocito nell'ampolla. La produzione di molecole da parte dell'ovocito in grado di attrarre gli spermatozoi (**chemiotassi**) è ben documentata in numerose specie, ma nei mammiferi tali molecole non sono state chiaramente identificate. Sullo spermatozoo umano è stata comunque dimostrata la presenza di un recettore olfattivo funzionante (hOR17-4), che riconosce il profumo del mughetto!

Va in ogni caso ricordato che la chemiotassi funziona solo a breve distanza, mentre il tratto che gli spermatozoi devono percorrere per arrivare all'ovocito è di circa 20 cm. Recentemente esperimenti condotti nei conigli hanno dimostrato che gli spermatozoi sono in grado di "sentire" differenze di temperatura e muoversi verso la temperatura più elevata (**termotassi**). Di fatto la temperatura dell'ampolla tubarica, dove si trova l'ovocito ovulato è superiore di circa due gradi rispetto a quella dell'istmo tubarico dove gli spermatozoi si accumulano durante la risalita verso l'ovocito.

## La zona pellucida

La zona pellucida (ZP) dell'ovocito umano è formata da quattro glicoproteine chiamate ZP1 (peso molecolare circa 100 kDa), ZP2 (circa 75 kDa), ZP3 (circa 55 kDa) e ZP4 (circa 65 kDa) (Fig. 8-9A). Sulla base di osservazioni condotte prevalentemente nel topo si ritiene che eterodimeri di ZP2, ZP3 e ZP4 formino filamenti tenuti insieme da ponti di ZP1 (Fig. 8-9B). Osservata al microscopio elettronico a scansione (SEM), la zona presenta una struttura spugnosa con una certa variabilità tra i diversi ovociti (Fig. 8-9C). Le glicoproteine della zona sono sintetizzate dall'ovocito stesso durante il periodo di crescita (vedi Capitolo 7). La zona svolge essenzialmente tre funzioni: 1) lega gli spermatozoi e ne induce la reazione acrosomiale; 2) partecipa al blocco della polispermia; 3) protegge l'embrione dopo la fecondazione impedendo che esso aderisca alla parete della tuba uterina prima di arrivare nell'utero. Come riportato più avanti, nell'uomo la ZP3 e la ZP2 legano gli spermatozoi, mentre la ZP1 e la ZP4, ma anche la ZP3, sono in grado di indurre AR. La reazione corticale (esocitosi dei granuli corticali) che si verifica nell'ovocito appena fecondato causa modificazioni della ZP conosciute come **zona hardening** (indurimento della zona), che la rendono impenetrabile agli spermatozoi (Fig. 8-7). L'analisi elettroforetica rivela che il peso molecolare delle ZP1 e ZP2 diminuisce sensibilmente dopo la fecondazione, probabilmente a seguito di proteolisi causata dagli enzimi rilasciati nella reazione corticale. A livello funzionale, mentre nel topo la ZP3 dopo la fecondazione perde la capacità di legare spermatozoi,



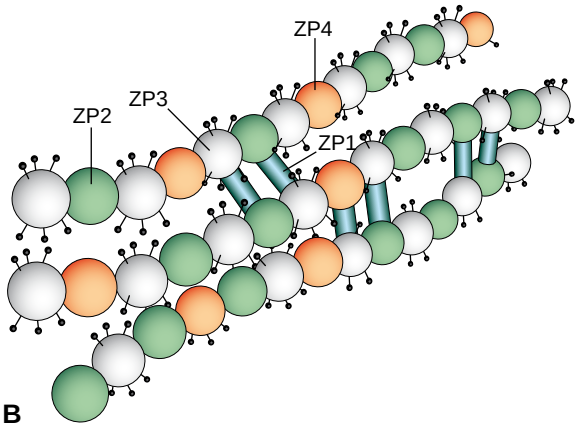




**Figura 8-9** ■ *A)* Elettroforesi bidimensionale delle proteine della zona pellucida dell'ovocito umano. *B)* Schema della struttura molecolare della zona pellucida. *C)* Fotografia al SEM della morfologia spugnosa più comune della zona pellucida di un ovocito umano.

nell'uomo la ZP2 e la ZP3 mantengono tale capacità, suggerendo che il blocco della polispermia a livello della zona nella nostra specie sia dovuto a modificazioni delle ZP che impediscono la penetrazione della zona da parte degli spermatozoi, ma non il loro legame.

## La reazione acrosomiale

Come spiegato in questo capitolo, la reazione acrosomiale (AR) è principalmente un processo di esocitosi che riguarda la fusione dell'acrosoma dello spermatozoo con la membrana plasmatica. È ancora dibattuto invece se sia il legame alla zona a causare l'AR. Recenti osservazioni nel topo indicano che nella maggior parte degli spermatozoi che fecondano, la reazione acrosomiale avviene o almeno inizia, prima che essi si leghino alla zona, probabilmente durante il passaggio attraverso il cumulo ooforo e forse indotta dall'acido ialuronico e/o dal progesterone prodotto dalle cellule del cumulo ooforo. Numerose evidenze sperimentali indicano, tuttavia, che la ZP3 murina e le ZP1, ZP3 e ZP4 umane sono in grado di indurre la reazione acrosomiale. Poiché, come riportato in precedenza l'AR causa il rilascio di enzimi solubili e l'esposizione di enzimi sulla membrana acrosomiale interna, sia che l'AR avvenga prima o dopo il legame alla zona, è comunque assicurata la digestione locale delle proteine della zona necessaria al passaggio dello spermatozoo. A livello molecolare l'AR è una fusione di membrane che richiede almeno due eventi; l'aumento di ioni $Ca^{2+}$ nel citoplasma dello spermatozoo e la fosforilazione di specifiche proteine nel suo citoplasma. Nella Figura 8-10 è riportato una schema delle complesse vie biochimiche implicate nell'AR.

## Molecole responsabili dell'adesione dello spermatozoo alla zona pellucida e all'ovolemma e della fusione spermatozoo-ovocito

Nel topo è stato dimostrato che, gli spermatozoi capacitati aderiscono alla ZP3, una delle tre glicoproteine che formano la zona pellucida dell'ovocito. In seguito, il legame alla ZP2 rafforza l'adesione. Sempre nel topo, sulla membrana dello spermatozoo sono state identificate diverse proteine in grado di legare la ZP3, chiamate **zona-**

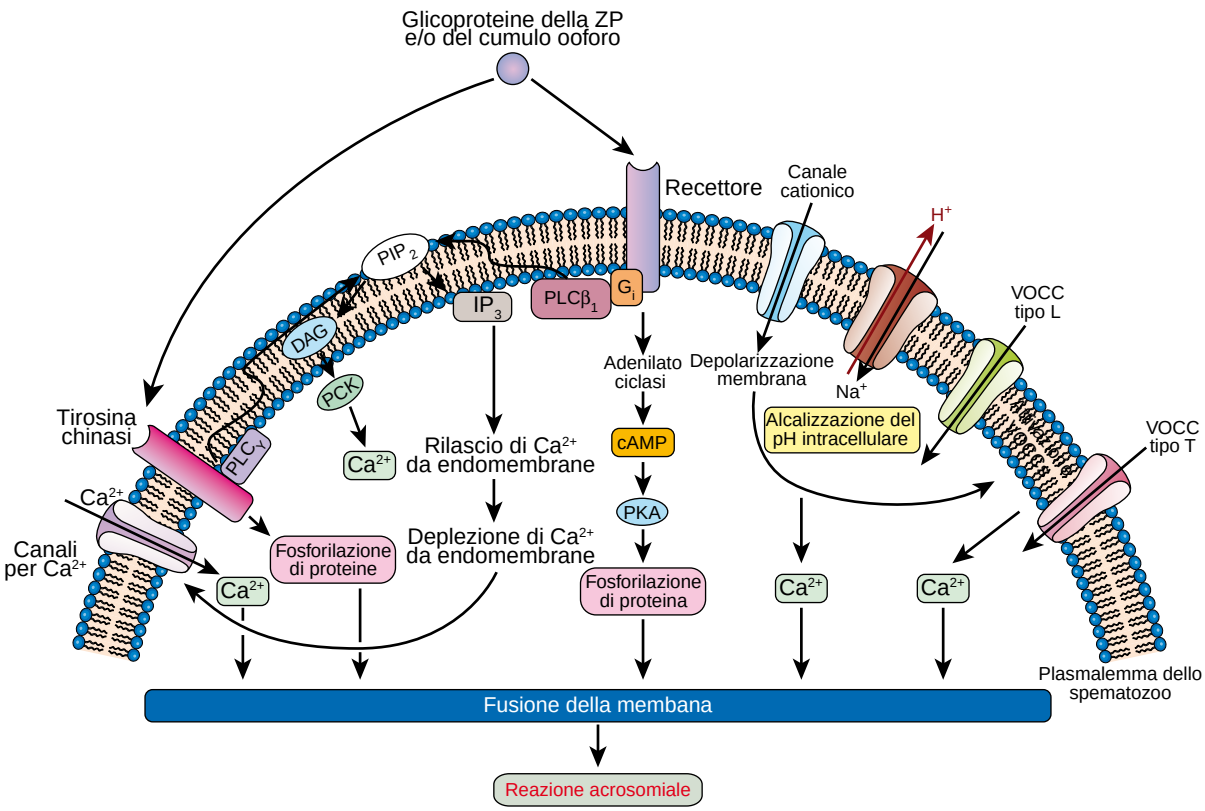



**Figura 8-10** ■ Schema delle vie biochimiche della AR. L'attivazione di recettori di membrana da parte di vari ligandi tra cui le ZP della zona pellucida e l'apertura di canali di membrana per il $Ca^{2+}$ a seguito da stimoli diversi, causano un aumento di ioni calcio e fosforilazioni nel citoplasma dello spermatozoo. Allo stesso tempo si verifica un'alcalinizzazione del citoplasma per attivazione di un pompa protonica. Tutte queste vie molecolari convergono nel favorire la fusione della membrana acrosomiale esterna con il plasmalemma. PLC = fosfolipasi C; DAG = diacil glicerolo; PCK = protein chinasi C; $PIP_2$ = fosfotidilinositolo-4,5-bifosfato; $IP_3$ = fosfotidil-3-fosfato; VOCC = canale per la $Ca^{2+}$ a controllo di voltaggio.

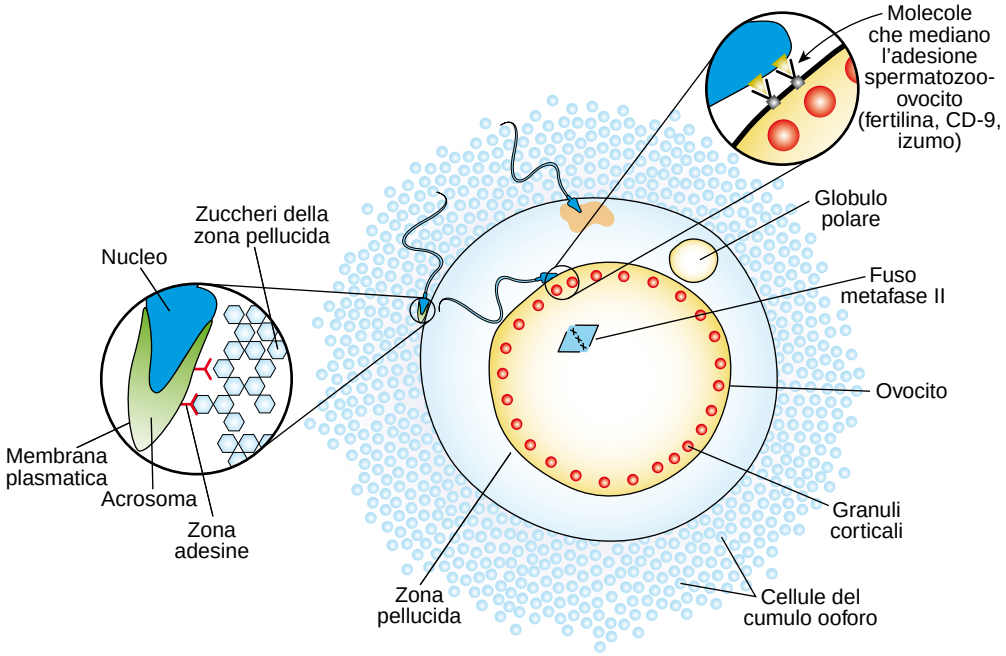



**FIGURA 8-11** ■ Molecole adesive sono responsabili dell'interazione dello spermatozoo con le glicoproteine della zona e mediano la sua adesione e fusione all'ovolemma.

**adesine** (Fig. 8-11). È probabile che queste proteine riconoscano sequenze oligosaccaridiche della ZP3. Tali sequenze sono diverse a seconda della specie e fanno sì che gli spermatozoi di una specie non possano legarsi alla zona di un ovocito di specie diversa. Anche nell'uomo la ZP3 svolge un ruolo primario nel legare gli spermatozoi mentre la ZP2 funge da recettore secondario per gli spermatozoi che sono andati già in contro alla AR; sequenze oligosaccaridiche e aminoacidiche della ZP3 sono implicate nel legame con gli spermatozoi.

Una molecola che sembra aver un ruolo importante nella successiva adesione tra la membrana dello spermatozoo e quella dell'ovocito è la **fertilina** (o PH-30). Si tratta di una proteina adesiva della famiglia delle ADAM (a disintegrin and metalloprotease) in grado di legarsi all'integrina $\alpha_6\beta_1$, presente sulla membrana dell'ovocito. Oltre che adesiva, la fertilina, poiché possiede una sequenza peptidica idrofobica, potrebbe favorire la fusione dei lipidi di membrana dei due gameti. Due altre proteine, la tetraspanina **CD-9**, sulla membrana dell'ovocito, e **izumo**, sulla membrana dello spermatozoo, sembra collaborino alla fusione della membrane dello spermatozoo e dell'ovocito. La proteina transmembrana CD9 è l'unica proteina ovocitaria sicuramente essenziale per la fusione tra i gameti: gli spermatozoi si legano a ovociti che mancano della CD9, ma non si fondono con essi; l'iniezione in questi ovociti di mRNA per CD9 (che ripristina nell'ovocito la possibilità di sintetizzare questa proteina) restituisce la capacità di fusione spermatozoo-ovocito. Izumo è stata recentemente localizzata sulla regione equatoriale dello spermatozoo dopo la AR

## Lo ione $Ca^{2+}$ e l'attivazione dell'ovocito

Tra gli eventi molecolari più caratterizzati che avvengono nell'ovocito entro pochi secondi o minuti dalla fecondazione, vi è l'**aumento dei livelli di ioni $Ca^{2+}$** nel citoplasma. In diverse specie, misurando con opportune tecniche le variazioni della concentrazione $Ca^{2+}$ nel citoplasma dell'ovocito alla fecondazione, si è osservato che tale aumento si verifica in modo oscillatorio per alcuni minuti facendo pensare che lo ione venga rilasciato da membrane interne dell'ovocito, in ondate successive che devono continuare per alcuni minuti affinché possa verificarsi l'attivazione dell'ovocito. Alcuni studi negli animali da esperimento indicano che il rilascio di $Ca^{2+}$ è causato da una molecola chiamata **SF** (sperm factor), rilasciata dallo spermatozoo al momento della fusione con l'ovolemma. Alcuni autori ritengono che tale fattore sia una fosfolipasi C (in particolare la **fosfolipasi zeta**, **PLCz**), un enzima in grado di generare il fosfolipide **inositide trifosfato** (IP3) dall'ovolemma. L'IP3 legandosi al suo recettore, presente sulle membrane del reticolo liscio dell'ovocito, causa il rilascio di $Ca^{2+}$ da questo organello. Questo primo aumento della concentrazione di $Ca^{2+}$ sarebbe quindi seguito dall'attivazione ciclica di un secondo tipo di recettori, i **recettori rianodinici**, associati ad altri canali del $Ca^{2+}$, la cui apertura causa le successive, ritmiche ondate di aumento dei livelli di $Ca^{2+}$ (Fig. 8-12).

## L'MPF e il fattore citostatico

Come descritto nelle precedenti sezioni, al momento della fecondazione l'ovocito non ha ancora completato la

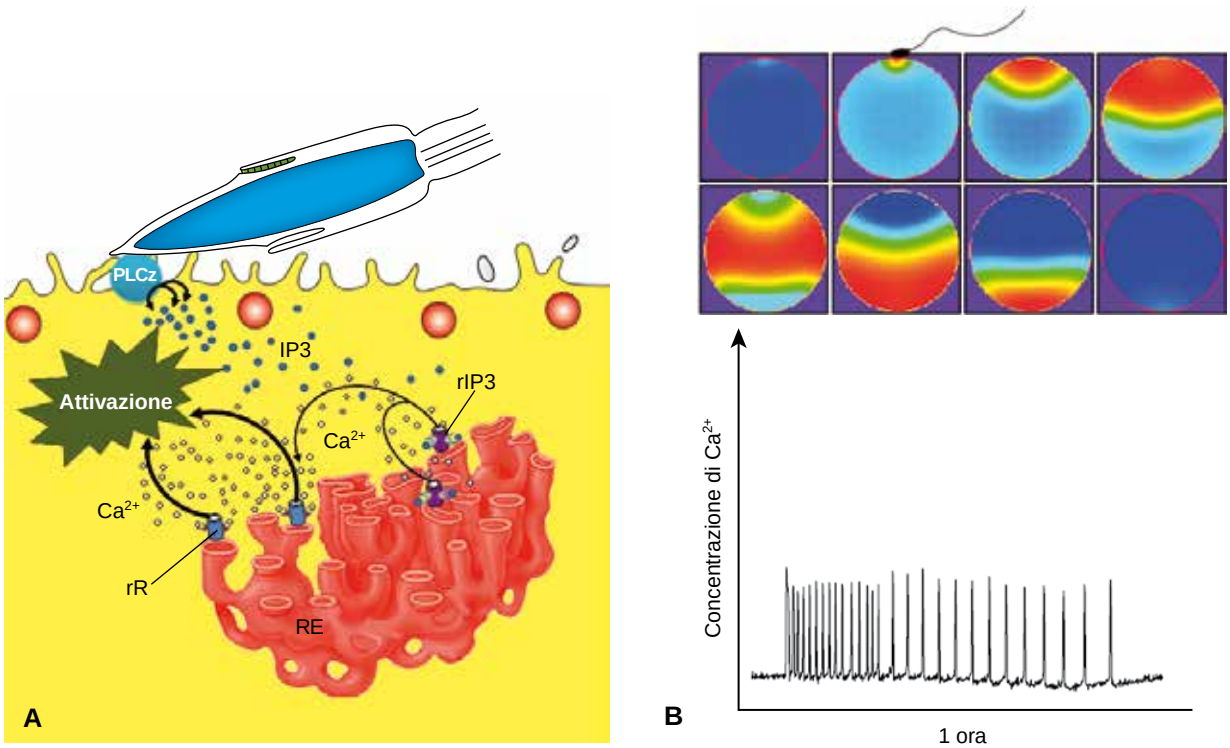



**FIGURA 8-12** ■ *A)* Schema del possibile meccanismo di rilascio di $Ca^{2+}$ alla fecondazione. Al momento della penetrazione dello spermatozoo, questo rilascia o provoca il rilascio di un fattore chiamato SF, forse una fosfolipasi zeta (PLCz) che causa il rilascio di IP3 dall'ovolemma; l'IP3 causa l'apertura di canali del $Ca^{2+}$ situati nel reticolo liscio e in sequenza l'attivazione di recettori rianodinici associati ad altri canali del $Ca^{2+}$; RE = reticolo endoplasmatico, rR = recettore rianodinico. *B)* In alto, visualizzazione al microscopio a fluorescenza dell'aumento di $Ca^{2+}$ (in rosso) in un ovocito di riccio di mare. (*Da* L. Wolpert, Principles of development, Current Biology LTD, 1998, Oxford University Press). In basso, registrazione di oscillazioni dei livelli di $Ca^{2+}$ alla fecondazione.

meiosi e si trova bloccato nella metafase della seconda divisione meiotica (MetII). Entro 2-4 ore dalla penetrazione dello spermatozoo nel citoplasma dell'ovocito, il blocco in MetII viene rimosso ed esso è in grado di completare la meiosi ed iniziare i cicli di divisione mitotica che caratterizzano le prime fasi dello sviluppo embrionale. Dopo più di 30 anni di ricerche condotte principalmente sugli ovociti di anfibio e del topo, sono stati chiariti i meccanismi molecolari responsabili del blocco della meiosi dell'ovocito alla metafase II e della ripresa e completamento di essa dopo la fecondazione (Fig. 8-13). In sintesi, possiamo dire che il complesso enzimatico **MPF** (**meiotic** o **mitotic promoting factor**), formato da due proteine, la CDC2 (cell division cycle 2) e la ciclina B2, ed enzimi chiamati **MAPK** (**mitogen-activated protein kinase**) cooperano per il mantenimento del blocco metafasico. Allo stesso tempo un altro complesso enzimatico chiamato **CSF** (**cytostatic factor** o **fattore citostatico**) inibisce la degradazione della ciclina B2 da parte del complesso **APC** (**anaphase promoting complex**) deputato al controllo del passaggio da metafase ad anafase. Un'elevata concentrazione di CDC2 è necessaria per mantenere attivo MPF. Per questo motivo il mantenimento del blocco in MetII dipende da una continua sintesi proteica. Per rimanere attivo CSF deve essere fosforilato dalle MAPK che a loro volta sono fosforilate e attivate dalla proteina **MOS** (**Moloney sarcoma**). Alla fecondazione l'aumento di $Ca^{2+}$ causa l'attivazione della chinasi **CaMKII** (**calcium-camodulin-dependent kinase II**) che sblocca questo sistema inibitorio mediante la degradazione di MOS e la fosforilazione di CDC2 mediata dalla fosfatasi **Wee1B**. Il complesso di questi eventi porta all'inattivazione di CSF e MPF e l'attivazione di APC, che determina il completamento della meiosi.

## *La partenogenesi, l'imprinting e la nascita di Kaguja*

Diversi eventi responsabili dell'attivazione dell'ovocito, in particolare l'aumento della concentrazione di $Ca^{2+}$ nel citoplasma, possono essere riprodotti da stimoli di varia natura. Questi stimoli sono in grado di indurre l'ovocito in metafase II ad iniziare lo sviluppo embrionale in assenza della fecondazione da parte dello spermatozoo. Tale fenomeno è chiamato **partenogenesi**. La partenogenesi è una forma di riproduzione asessuale che si verifica in natura in molte piante, diverse specie di invertebrati e alcuni vertebrati (qualche rettile, anfibio, pesce e

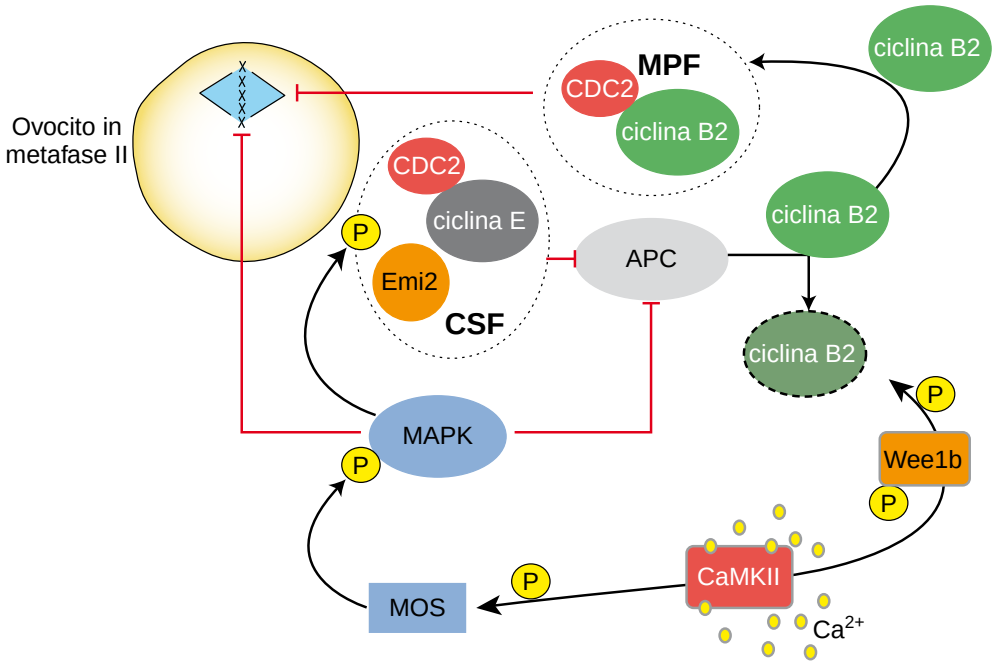



**Figura 8-13** ■ Schema dei meccanismi molecolari che mantengono l'ovocito di mammifero bloccato nella metafase II. Notare che CSF è formato dal complesso CDC2/ciclina E e da Emi2. Alla fecondazione (riquadro verde)l'aumento di $Ca^{2+}$ causa l'attivazione della chinasi CaMKII (calcium-camodulin-dependent kinase II) che sblocca questo sistema inibitorio mediante la degradazione di MOS e la fosforilazione di CDC2 mediata dalla fosfatasi Wee1B. Questi eventi portano all'inattivazione di CSF e MPF e all'attivazione di APC.

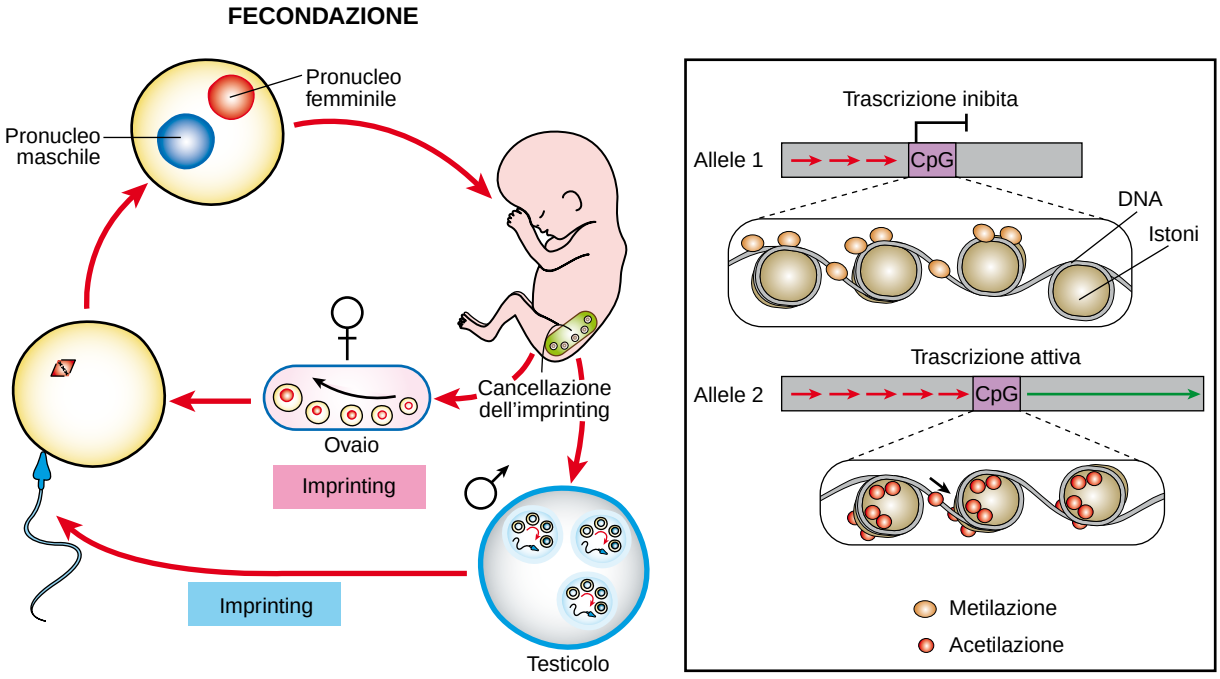



**Figura 8-14** ■ Andamento dell'imprinting nelle cellule germinali. Alla fecondazione nello zigote sono presenti il pronucleo materno (rosa) e paterno (blu) con imprinting primari diversi. Nell'embrione l'imprinting rimane inalterato nelle cellule somatiche (imprinting secondario), mentre è cancellato nelle cellule germinali primordiali (PGCs). Da queste derivano i gameti che nel corso delle successive fasi della gametogenesi maschile e femminile subiranno un nuovo imprinting. A destra è mostrato come la metilazione in una regione del gene, in particolare in una regione del promotore ricca di coppie citosina/guanina (CpG) ne causi l'inattivazione (impossibilità di trascrizione); quando questo si verifica il gene è considerato "imprintato"; al contrario l'assenza di metilazione, o l'acetilazione della stessa regione, permette la trascrizione del gene.

uccello). Nei mammiferi è possibile indurre sperimentalmente partenogenesi stimolando l'ovocito con composti che causano aumento di $Ca^{2+}$ nel citoplasma oppure inibendo la sintesi proteica con specifiche sostanze. Tuttavia l'embrione partenogenetico di mammifero, pur potendo raggiungere stadi di sviluppo piuttosto avanzati (sviluppo dei somiti nel topo), non può svilupparsi fino al termine della gravidanza. Oggi sappiamo che tale arresto è dovuto soprattutto al mancato differenziamento dei tessuti della placenta che richiede la presenza di geni paterni. È noto, infatti, che alcuni geni (circa ottanta nel topo) subiscono nelle cellule germinali delle modificazioni epigenetiche del DNA (ovvero modificazioni che non riguardano la sequenza delle basi nucleotidiche) diverse nei due sessi. Tali modificazioni consistono in primo luogo in metilazioni delle citosine del DNA e generalmente inibiscono la trascrizione del gene. Questo fenomeno, chiamato **imprinting primario** (Fig. 8-14), fa sì che nello zigote i genomi paterno e materno non siano equivalenti (i geni che durante la gametogenesi sono stati *imprinted* rimangono inattivi in uno dei due genomi), e abbiano un'espressione monoallelica invece che biallelica come accade per gli altri geni. Poiché per la crescita dell'embrione e lo sviluppo della placenta è richiesto il corretto livello di attività di alcuni di questi geni, è fondamentale che alla fecondazione siano presenti sia il genoma materno che paterno. In un embrione, pur con un genoma diploide, ma esclusivamente materno, mancherebbe infatti l'espressione di alcuni alleli paterni; il contrario avverrebbe per un embrione con un genoma diploide esclusivamente paterno. Per esempio, come sopra riportato, lo sviluppo della placenta richiede l'attività di geni paterni che nel genoma materno sono inibiti dall'imprinting. D'altro canto il solo genoma paterno in assenza di quello materno, porterebbe ad un eccessivo sviluppo della placenta e una scarsa o assente crescita dell'embrione, controllata invece prevalentemente da geni materni, che nel genoma paterno sono inattivi a seguito dell'imprinting. Questo è proprio quello che si verifica nella **mola idatiforme** di cui si parlerà nel Capitolo 9. In questa patologia, generalmente dovuta a fecondazione da parte di due spermatozoi, si ha un incontrollato sviluppo del trofoblasto che contiene cromosomi tutti di origine paterna. Sperimentalmente negli anni '80, si dimostrò che era possibile ottenere lo sviluppo iniziale di ovociti con due pronuclei maschili (*androgenoni*, con almeno un cromosoma X) o femminili (*ginogenoni*). Nel primo caso si otteneva lo sviluppo praticamente del solo trofoblasto, in modo simile alla mola idatiforme, nel secondo caso si sviluppava un embrione di ridotte dimensioni, ma privo di tessuti placentari destinato ad essere abortito (Fig. 8-15).

L'imprinting primario si stabilisce, come detto, nelle cellule germinali durante la gametogenesi e una volta stabilito, dopo la fecondazione è mantenuto nelle cellule somatiche dell'embrione e dell'individuo che nascerà. Nelle cellule germinali primordiali dell'embrione (vedi Capitolo 16), invece, l'imprinting è cancellato al momento del loro ingresso nelle creste gonadiche (le future gonadi), in modo tale che durante le successive fasi della gametogenesi possa instaurarsi un imprinting ex novo in maniera dipendente dal sesso.

La dimostrazione forse più elegante dell'importanza dell'imprinting per lo sviluppo embrionale è venuta da

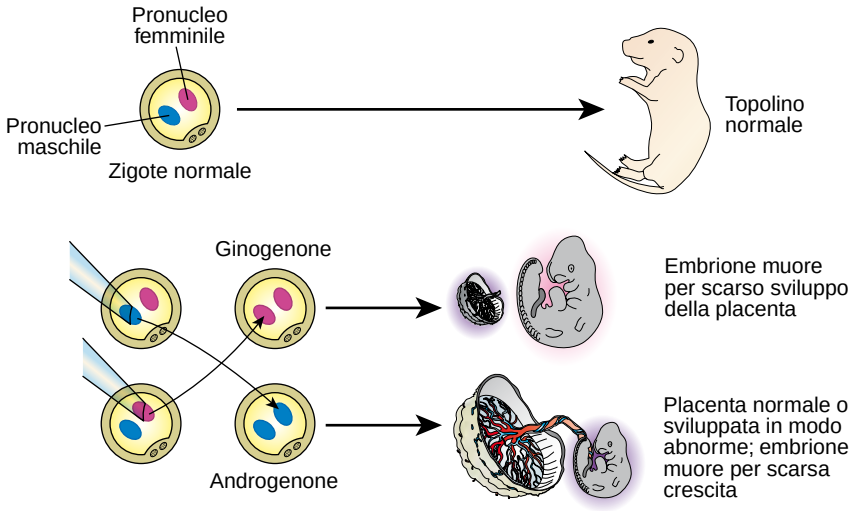



**Figura 8-15** ■ Il trasferimento del pronucleo femminile e maschile in uno zigote privato rispettivamente del pronucleo maschile e femminile in modo che esso contenga un genoma tutto materno o tutto paterno porta ad uno sviluppo embrionale anomalo per la mancanza di alleli di geni che a causa dell'imprinting sono silenti nel genoma maschile o femminile. In entrambi i casi l'embrione è destinato a morire. Lo zigote con il solo genoma materno (ginogenoma) dà origine ad un embrione che si sviluppa quasi normalmente fino ad un certo stadio, ma che poi muore per lo scarso sviluppo della placenta, lo zigote con il solo genoma paterno (androgenone) dà origine ad un embrione scarsamente sviluppato con una placenta normale (nell'uomo questa condizione causa la mola idatiforme).

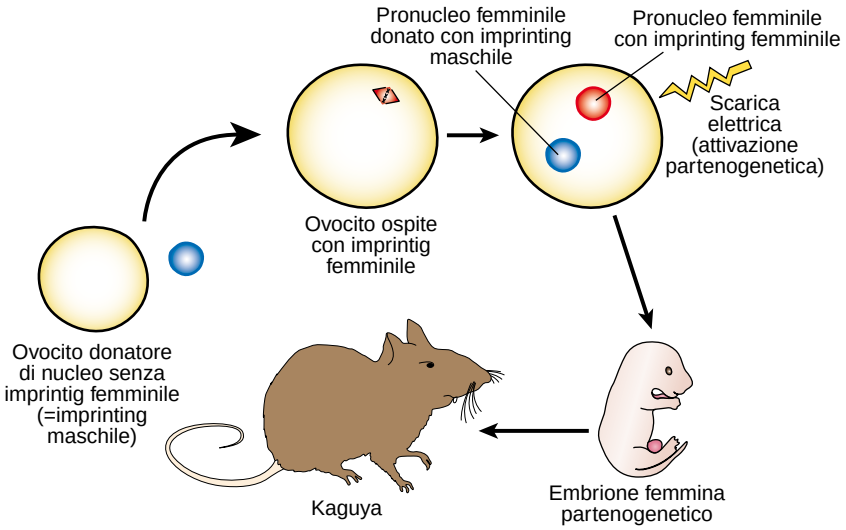



**Figura 8-16** ■ Schema dell'esperimento di Kono e coll. 2007, che ha portato alla nascita della topolina chiamata Kaguya, senza il contributo di uno spermatozoo. Un ovocito contenente due genomi femminili è stato attivato partenogeneticamente con una scarica elettrica ed indotto a sviluppare un embrione in grado di dare origine ad una topolina vitale. Il genoma dell'ovocito donatore presentava un imprinting di tipo maschile per le ragioni spiegate nel testo.

ricerche condotte da un gruppo di ricercatori giapponesi nel 2004. Questi ricercatori hanno messo a punto una tecnica complessa per far nascere dei topi senza la fecondazione da parte degli spermatozoi. In breve, l'esperimento è consistito nel trasferire in un ovocito MetII il nucleo di un secondo ovocito prelevato da una topolina appena nata e nell'attivare partenogeneticamente l'ovocito ospite con una scarica elettrica. Uno di questi partenogenoni fu in grado di svilupparsi normalmente in una topolina che fu chiamata Kaguja (che in giapponese significa "nata sotto un cavolo", Fig. 8-16). Il "trucco" dell'esperimento era che il genoma del nucleo dell'ovocito trapiantato non aveva ancora subito l'imprinting femminile, ovvero l'inattivazione di geni che di norma avviene durante l'ovogenesi, ed era stato inoltre modificato artificialmente dai ricercatori in modo da riprodurre l'imprinting maschile in alcuni geni chiave per lo sviluppo embrionale. In sostanza, il genoma dell'ovocito donatore possedeva un imprinting equivalente a quello dello spermatozoo. Con questo complesso esperimento si è dimostrato per la prima volta che nei mammiferi un nuovo individuo può nascere da due madri senza un padre. Attualmente questa tecnica permette di generare topoline partenogenetiche con una frequenza paragonabile a quella della fecondazione in vitro (circa 90%). Con una certa sorpresa si è osservato che le topoline partenogenetiche invecchiando non accumulano tessuto adiposo e vivono tre volte più a lungo delle topoline generate da una normale fecondazione!

Da notare infine che l'imprinting può causare la trasmissione di patologie ereditarie in un modo che dipende dal sesso dell'individuo che la trasmette. Per esempio, la stessa delezione di una regione di uno dei due cromosomi 15 (15q11.2-q13) trasmessa dal padre causa la sindrome di Prader-Willi, trasmessa dalla madre causa la sindrome di Angelman. Si è dimostrato che nella regione che viene deleta del cromosoma 15 sono localizzati diversi geni con imprinting. Poiché, come spiegato sopra, l'imprinting è diverso nei due sessi, le conseguenze della perdita dei geni siti su questa regione saranno diverse a seconda che il cromosoma deleto provenga dal padre o dalla madre.

## ASPETTI CLINICI

### *Le tecniche di fecondazione assistita*

Circa il 10% delle coppie non sono fertili. La causa più frequente d'infertilità è l'occlusione delle tube uterine nella donna. In questi casi l'unico rimedio attualmente disponibile è la fecondazione dell'ovocito al di fuori del corpo della madre (in vitro) con successivo trasferimento dell'embrione nell'utero. Questa **tecnica di riproduzione assistita** (**assisted reproductive technology**, **ART**) chiamata **FIVET** (**in vitro fertilization and embryo transfer**) (Fig. 8-17), si svolge in quattro tappe: l'induzione dell'ovulazione nella paziente (superovulazione), il prelievo degli ovociti, la fecondazione in vitro (**in vitro fertilization, IVF**) e l'inserimento dell'embrione nell'utero. Con tale tecnica il 20-25% degli embrioni trasferiti in utero arrivano fino alla fine della gravidanza. Nel 1958, Anne McLaren e John Biggers riportarono per la prima volta la nascita di una topolina da un embrione coltivato in vitro e trasferito nell'utero di una topolina madre adottiva. Un anno dopo M.C. Chang riportò la prima IVF nei mammiferi, in particolare nel coniglio; la prima IVF nel topo è stata ottenuta David G. Whittingham, nel 1968.

Il fisiologo R. Edwards e il ginecologo P. Steptoe, dopo aver lavorato per dieci anni sulla fecondazione di

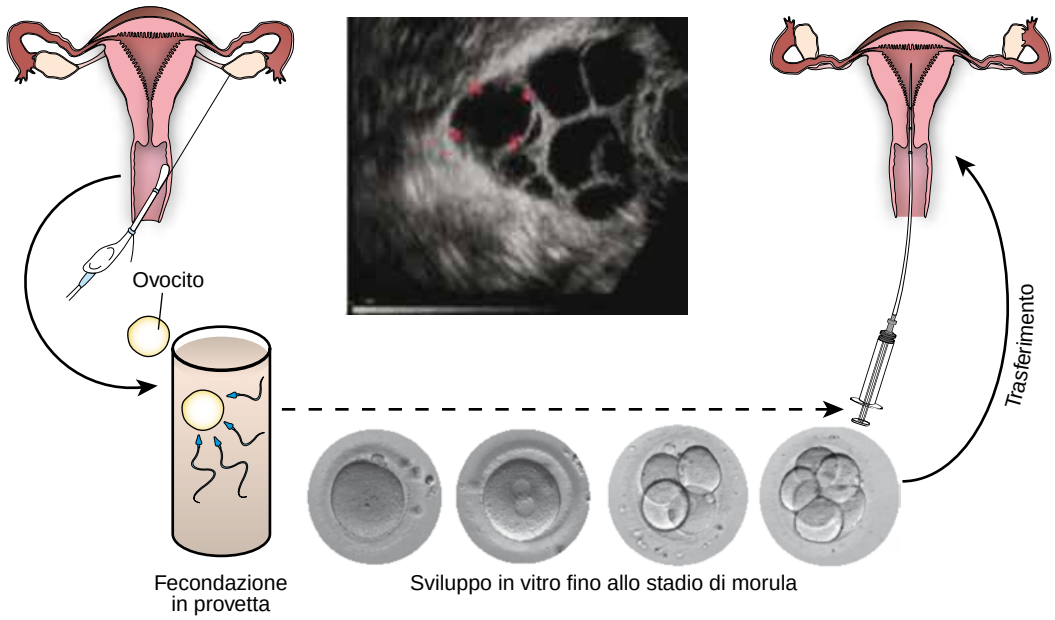



**FIGURA 8-17** ■ Schema delle fasi principali della FIVET. L'ovocito viene prelevato da un ovaio dopo che la donna è stata sottoposta a stimolazione ormonale per l'induzione dell'ovulazione (in alto a sinistra visualizzazione ecografica di follicoli preovulatori nell'ovaio [aree scure]), quindi l'ovocito è trasferito in una soluzione di spermatozoi per la fecondazione. L'embrione viene lasciato in coltura per 2-3 giorni e quando si è diviso più volte viene trasferito allo stadio di morula nell'utero della donna.

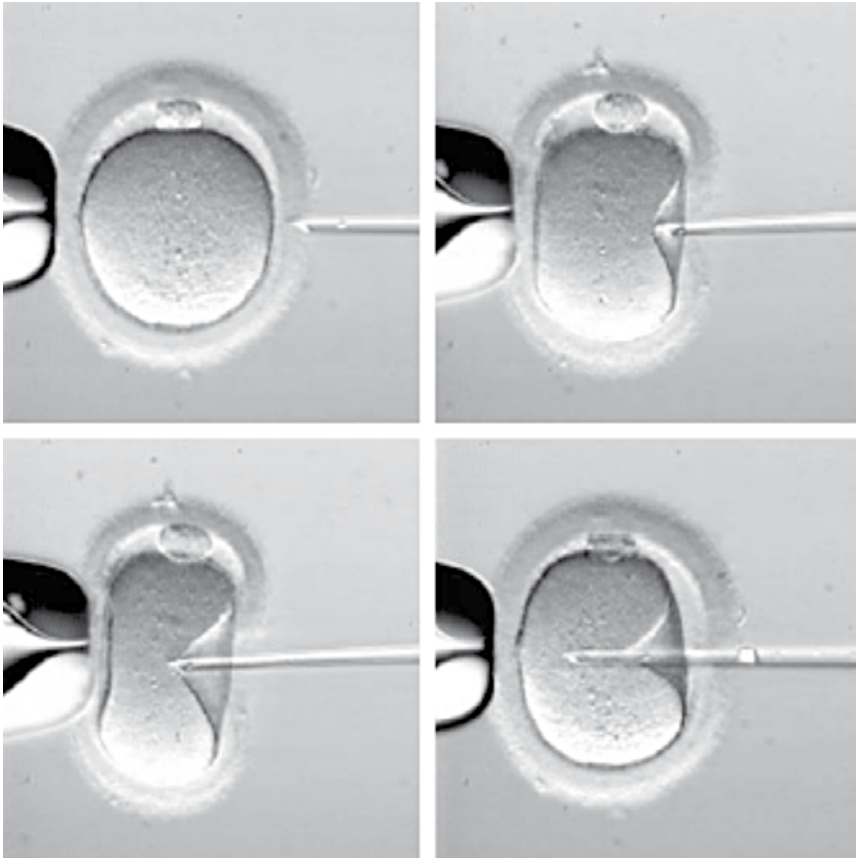


**FIGURA 8-18** ■ Immagini al microscopio ottico delle ultime fasi del metodo ICSI: uno spermatozoo viene trasferito con una pipetta all'interno dell'ovocito.

ovociti umani in vitro, riuscirono ad ottenere per la prima volta con la FIVET una gravidanza e un parto il 25 luglio 1978. La bambina si chiamava Louise Brown. Si calcola cha attualmente nel mondo più di un milione di bambini siano nati grazie alla FIVET.

Una tecnica di fecondazione assistita più semplice chiamata **GIFT** (**gamete intrafallopian transfer**) è possibile, quando l'infertilità è dovuta ad un basso numero di spermatozoi nel seme (<10-15 milioni/ml, **oligospermia**). Tra le cause di oligospermìa vi sono l'abuso di alcol o di sostanze stupefacenti, l'assunzione di alcuni farmaci, le infezioni delle vie genitali, alcune malattie sistemiche, il varicocele, il criptorchidismo e alcune disfunzioni ormonali; vi sono infine una forma psicogena e una idiopatica (da cause sconosciute). In questi casi gli spermatozoi sono concentrati per centrifugazione e poi trasferiti direttamente nell'ampolla tubarica poco dopo l'ovulazione. Recentemente si è affermata una terza tecnica di fecondazione assistita chiamata **ICSI (intracytoplasmic sperm injection)** (Fig. 8-18) utilizzata in casi di severa oligospermia, d'immobilità ed immaturità degli spermatozoi. Mediante un micromanipolatore e un idoneo microscopio, uno spermatozoo è iniettato direttamente nel citoplasma dell'ovocito. Gli embrioni così prodotti sono quindi trasferiti nella tuba uterina o nell'utero della donna. Uova fecondate ed embrioni in stadi iniziali di sviluppo possono essere conservate per lunghi periodi per congelamento in azoto liquido in un opportuno mezzo di coltura e in seguito scongelati e trapiantati nell'utero.

## Lo spermiogramma

L'analisi del liquido seminale è chiamata comunemente **spermiogramma**. Lo spermiogramma serve ad evidenziare le varie componenti e caratteristiche dello sperma al fine di dare una valutazione della fertilità e più in generale dello stato di salute di tutto l'apparato genitale. I parametri più comuni che vengono misurati sono il pH, la viscosità, il tempo di fluidificazione, il numero di spermatozoi per ml, la percentuale di forme normali, la percentuale di motilità degli spermatozoi e la concentrazione dei leucociti per ml di sperma (Fig. 8-19).

## Metodi anticoncezionali e immunocontraccezione

Oltre ai metodi anticoncezionali che impediscono l'ovulazione e lo sviluppo dell'embrione, descritti in altri paragrafi, alcuni contraccettivi si basano sulla possibilità di impedire la fecondazione interferendo con le interazioni spermatozoo-ovocito descritte in questo capitolo. Naturalmente il modo più semplice per bloccare tali interazioni è impedire agli spermatozoi di essere deposti nelle vie genitali femminili o di raggiungere l'ovocito ovulato. A tale scopo è noto che possono essere utilizzate barriere di varia natura che includono il profilattico maschile e il diaframma femminile. La chiusura chirurgica delle tube è il metodo più drastico per impedire la risalita degli spermatozoi verso l'ovocito ovulato. In modo analogo la chiusura dei deferenti nel maschio impedisce l'emissione degli spermatozoi nello sperma. Entrambe queste procedure causano, tuttavia, sterilità generalmente irreversibile. Numerose ricerche si sono concentrate sullo studio di proteine presenti sull'ovocito e lo spermatozoo per un loro impiego come potenziali antigeni per la produzione di vaccini anticoncezionali. In altre parole si è sperimentato se l'utilizzo di anticorpi contro molecole implicate nell'adesione dello spermatozoo alla zona pellucida e nella sua penetrazione nell'ovocito possa impedire in modo efficace, reversibile e senza produrre effetti collaterali indesiderati la fecondazione. L'impiego di anticorpi contro proteine della zona pellucida è stato sperimentato in numerose specie animali con risultati incoraggianti, ma che necessitano di ulteriori verifiche prima di essere applicato all'uomo.

Da molti anni vengono condotti esperimenti per produrre un anticoncezionale maschile, scherzosamente detto "pillolo", ma fino ad oggi non si sono ottenuti risultati significativi.

## Possibilità di decidere il sesso di un embrione

Poiché il sesso di un embrione dipende dallo spermatozoo che feconda l'ovocito (se lo spermatozoo porta un cromosoma X l'embrione sarà femmina, se lo spermatozoo porta un cromosoma Y l'embrione sarà maschio) (Fig. 8-20), separando gli spermatozoi X da quelli Y, e ri-

| Tipo di esame | |
|---|---|
| Volume | 2-6 ml |
| pH | 7,2-8,0 |
| Tempo liquefazione | 20 min |
| Cellule estranee | Assenza di globuli bianchi e rossi |
| Numero spermatozoi | >20 milioni/ml |
| Morfologie normali | >20% |
| Motilità | >25% |

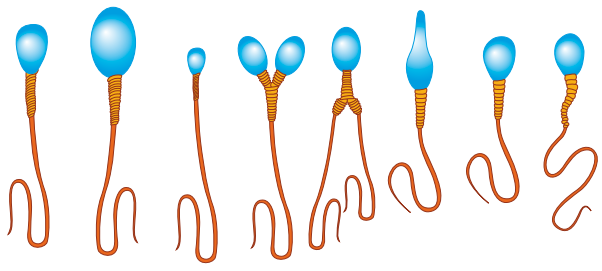


**Figura 8-19** ■ A sinistra, tabella con valori di uno spermiogramma normale e, a destra, morfologia di uno spermatozoo normale (il primo a sinistra) e diverse morfologie anomale.

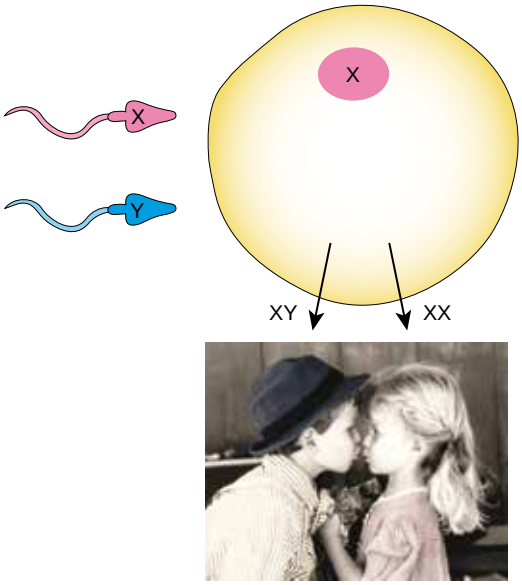



**FIGURA 8-20** ■ Determinazione del sesso di un individuo alla fecondazione.

correndo quindi alle tecniche della fecondazione assistita, è possibile predeterminare il sesso di un embrione. Attualmente la tecnica che permette la separazione degli spermatozoi X e Y con la più alta efficienza, intorno al 70-80%, si basa sulla possibilità di legare al cromosoma X o Y delle molecole colorate fluorescenti che consentono ad un'apparecchiatura chiamata **citofluorimetro** o **FACS (fluorescent activated cell sorter)** di separare gli spermatozoi sulla base della fluorescenza.

## Bibliografia citata nel testo e letture consigliate

Aitken RJ, McLaughlin EA. Molecular mechanisms of sperm capacitation: progesterone-induced secondary calcium oscillations reflect the attainment of capacitation state. Society of Reproduction Fertility, suppl 63, 273, 2007.

Bahat A e coll. Thermotaxis of mammalian sperm cell: a potential navigation mechanism in the female genital tract. Nature 9, 149-150, 2003.

Baibakov B e coll. Sperm binding to the zona pellucida is not sufficient to induce acrosome exocytosis. Development 134, 933-943, 2007.

Brewis I e coll. Molecular mechanisms during sperm capacitation. Human Fertility 8, 253-261, 2005.

Gupta SK, Bhandari B. Acrosome reaction: relevance of zona pellucida glycoproteins. Asian Journal of Andrology 13, 97-105, 2011.

Kawahara M, Wu Q, Takahashi N, Morita S, Yamada K, Ito M, Ferguson-Smith AC, Kono T. High-frequency generation of viable mice from engineered bi-maternal embryos. Nat Biotechnol 25, 1045-1050, 2007.

Kono T e coll. Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. Nature 428, 860-864, 2004.

Madgwick S, Jones KT. How eggs arrest at metaphase II: MPF stabilization plus APC/C inhibition equals cytostatic factor. Cell Division 2, 4-7, 2007.

Magerkurth C e coll. Scanning electron microscopy analysis of human zona pellucida: influence of maturity and fertilization on morphology and sperm binding pattern. Human Reproduction 14, 1057-1067, 1999.

Miyazaki S, Ito M. Calcium signals for egg activation in mammals. Journal Pharmacological Science 100, 545-552, 2006.

Primakoff P, Myles D. Penetration, adhesion and fusion in mammalian sperm-egg interaction. Science 296, 2183-2185, 2002.

Schultz R, Williams C. Sperm-egg fusion unscrambled. Nature 434, 152-155, 2005.

Suarez SS, Pacey AA. Sperm transport in the female reproductive tract. Human Reproduction Update 12, 23-37, 2006.

Talmor-Cohen A e coll. Siognalling in mammalian egg activation: role of protein kinases. Molecular and Cellular Endocrinology 187, 145-152, 2002.

Tilghman SM. The sins of fathers and mothers: genomic imprinting in mammalian development. Cell 96, 185-193, 1999.

Visconti P, Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. PNAS 20, 667-668, 2009.

Wang J, Sauer MV. In vitro fertilization (IVF): a review of 3 decades of clinical innovation and technological advancement. Therapeutics and Clinical Risk Management 2, 355-364, 2006.

Wolpert L. Principles of development, Current Biology LTD and Oxford University Press, 1998, 371-397.

Yanagimachi R. Mammalian sperm acrosome reaction: where does it begin before fertilization? Biology of Reproduction 85, 4-5, 2011.

# Prima e seconda settimana di sviluppo

## Segmentazione, impianto ed embrione bilaminare

Massimo De Felici

VIDEO 2

### LA PRIMA SETTIMANA DI SVILUPPO

#### Discesa verso l'utero e segmentazione dell'embrione

La prima divisione mitotica dello zigote, che produce due cellule chiamate **blastomeri**, avviene circa 24-30 ore dopo la fecondazione. Nel frattempo lo zigote, spinto dal battito delle ciglia dell'epitelio di rivestimento e dalla contrazione della muscolatura della tuba uterina, comincia a discendere verso l'utero (Figg. 9-1 e 9-2).

Altre mitosi si susseguono ma, non essendo sincrone tra i vari blastomeri, l'embrione passa attraverso stadi in cui è formato da 3, 4 e 5 cellule. Poiché tali divisioni avvengono senza essere precedute da un apprezzabile aumento di volume delle cellule, vengono chiamate **segmentazioni**.

Al terzo giorno, l'embrione è formato da 8-16 blastomeri scarsamente adesi tra loro e viene chiamato **morula** (Fig. 9-3). Esso va ora incontro ad un evidente cambiamento di forma. I blastomeri si appiattiscono, aderiscono strettamente gli uni agli altri mediante la proteina adesiva E-caderina e i contorni cellulari divengono difficilmente visibili (fenomeno della **compattazione**, vedi Capitolo 2) (Fig. 9-4). I blastomeri più superficiali tendono ad appiattirsi rispetto a quelli interni. Al quarto giorno l'embrione arriva nell'utero; è ora formato da 32-64 cellule e va incontro ad altri evidenti cambiamenti morfologici. Le cellule più esterne della morula differenziano in un monostrato di cellule epiteliali polarizzate di forma piatta chiamato **trofoblasto**, mentre quelle più interne formano un gruppo di cellule chiamato **massa cellulare interna** (inner cell

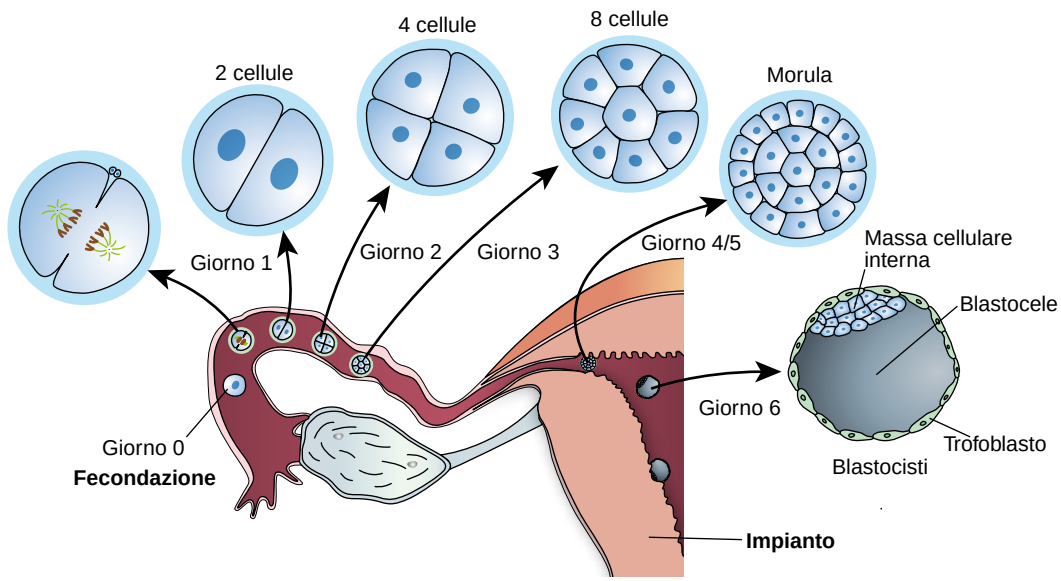



**FIGURA 9-1** ■ Discesa dell'embrione dall'ampolla tubarica verso l'utero.

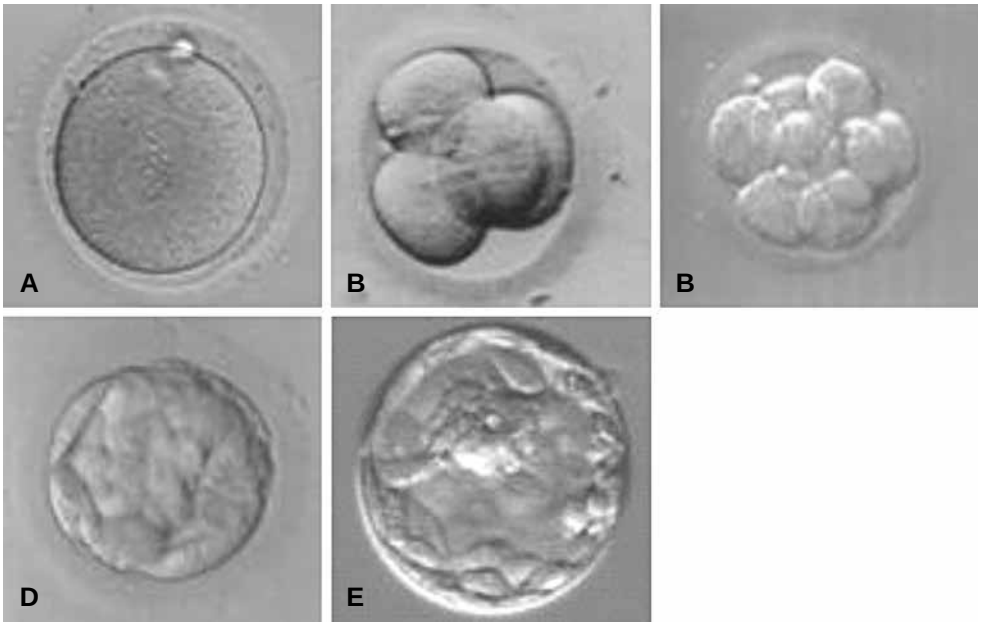



**Figura 9-2** ■ Stadi dello sviluppo dell'embrione umano: *A)* zigote, *B)* 4 cellule, *C)* 8 cellule, *D)* morula, *E)* blastocisti.

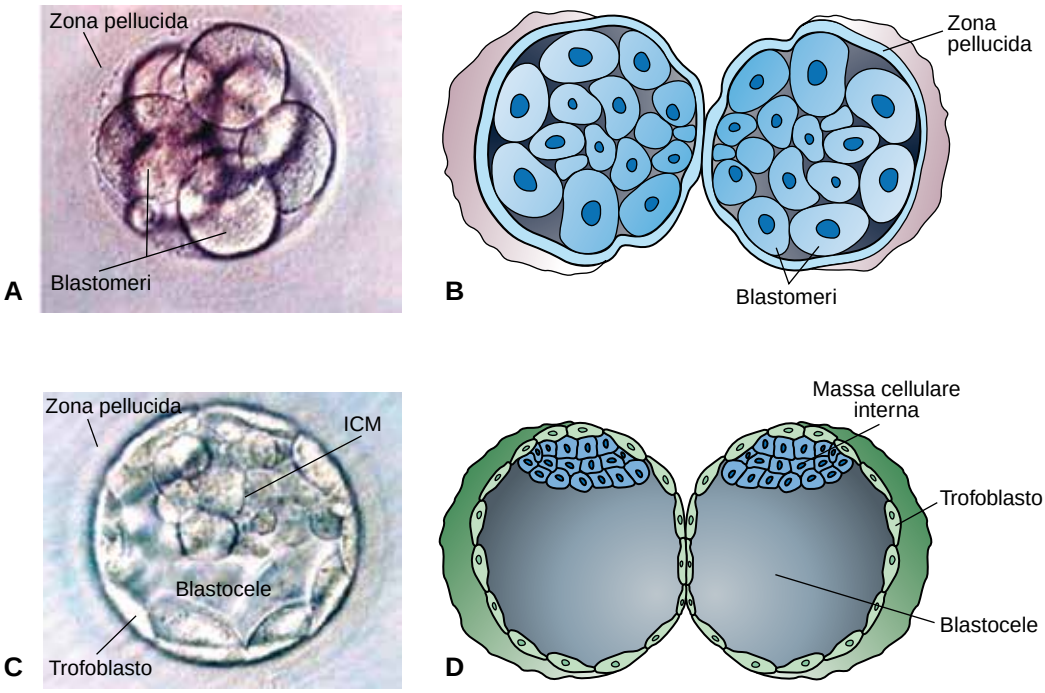



**Figura 9-3** ■ *A)* Fotografia al microscopio ottico di un embrione umano allo stadio di morula; *B)* disegno di una morula; *C)* fotografia al microscopio ottico di un embrione umano allo stadio di blastocisti; *D)* disegno di una blastocisti tardiva senza la zona pellucida.

mass, ICM, o nodo embrionale o embrioblasto). Con il differenziamento del trofoblasto e della massa cellulare interna si formano due popolazioni cellulari con destini differenziativi diversi: dal trofoblasto avranno origine i tessuti fetali della placenta (corion embrionale), mentre dalla massa cellulare interna avranno origine i tre foglietti germinativi primari, **ectoderma**, **mesoderma** ed **endoderma**, da cui deriveranno tutti i tessuti dell'embrione e due annessi embrionali, il sacco amniotico e il sacco vitellino.

**Figura 9-4** ■ Morula umana al SEM (scanning electronic microscope) a sinistra prima e, a destra, durante la compattazione. (Per gentile concessione di D.F. Albertini, Università di Tufts, Boston.)

Le cellule del trofoblasto sono unite tra loro mediante complessi di giunzione (zonula occludens, zonula adherens, desmosomi e gap junctions) e possiedono sistemi di trasporto attivo (pompe proteiche) per gli ioni $Na^+$, $K^+$ e $Cl^-$ e canali per il passaggio di acqua (aquaporine). Questi ultimi funzionano in modo da richiamare acqua dai fluidi circostanti per osmosi e accumularla tra le cellule dell'ICM. Tra queste si formano quindi piccoli spazi pieni di liquido che confluiscono progressivamente in un'unica cavità, il **blastocele**. L'embrione è ora chiamato **blastocisti** (4°-5° giorno) (Fig. 9-3). Questa è chiaramente polarizzata con l'ICM da una parte, polo embrionale, e il blastocele dalla parte opposta, polo abembrionale. La polarizzazione riguarda anche l'ICM e il trofoblasto. Le cellule dell'ICM che rimangono adese alla parete interna del trofoblasto segnano una primitiva regione dorsale, mentre quelle bagnate dal fluido del blastocele indicano la futura regione ventrale dell'embrione. Nel trofoblasto si distinguono due regioni, il trofoblasto polare, che sovrasta l'ICM e il trofoblasto murale, che circonda il blastocele.

## Inizio dell'impianto embrionale

L'**impianto** o **annidamento** dell'embrione è l'insieme dei processi di adesione e penetrazione della blastocisti nell'endometrio uterino. Quando la blastocisti arriva nell'utero, l'endometrio si trova nella fase progestinica o secernente (fase recettiva) (vedi Capitolo 7). Il progesterone e in minor misura l'estradiolo 17β, prodotti dal corpo luteo nell'ovaio, sostengono in questa fase la recettività della mucosa uterina e sono indispensabili per l'impianto. La blastocisti rimane libera nella cavità dell'utero per almeno due giorni (il 4° e il 5° giorno). Poco prima dell'impianto essa si rigonfia per accumulo di liquido prodotto dal trofoblasto e il suo diametro passa da 150 a 300 μm; la blastocisti è ora formata da circa 120 cellule (circa 80 cellule del trofoblasto e 40 cellule della massa cellulare interna). La zona pellucida, che ancora la circonda, si assottiglia. Verso il 5° giorno la blastocisti fuoriesce dalla zona pellucida (fenomeno dello **sgusciamento** o **schiusa**) attraverso un'apertura nella zona provocata dall'azione di enzimi proteolitici (zona lisine) prodotti dalla stessa blastocisti e in parte dai tessuti dell'utero (Fig. 9-5). Una volta sgusciata dalla zona,

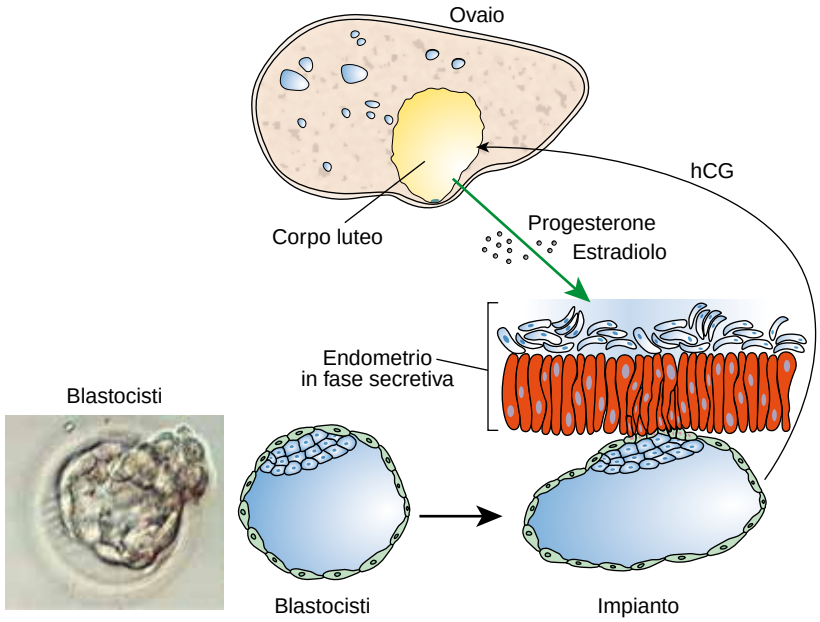



**Figura 9-5** ■ A sinistra, una blastocisti nella fase di sgusciamento dalla zona al MO (microscopio ottico), in basso al SEM. A destra, schema di una blastocisti priva della zona che aderisce ed inizia l'impianto nell'endometrio uterino stimolato dal progesterone prodotto dal corpo luteo nell'ovaio. Notare che la blastocisti inizia a produrre piccole quantità dell'ormone hCG necessario a mantenere attivo il corpo luteo.

l'impianto della blastocisti avviene in tre fasi: **apposizione**, **adesione** e **invasione**. Nell'apposizione i microvilli presenti sul trofoblasto polare della blastocisti interagiscono con delle microprotrusioni delle cellule epiteliali dell'endometrio chiamate **uterodomi** o **pinopodi** (così chiamati per la loro funzione pinocitosica dimostrata in alcune specie). Gli uterodomi, che rappresentano una caratteristica ultrastrutturale dell'endometrio nella sua fase di maturazione, sono stati proposti come marcatori della recettività uterina. Grazie a questa interazione, la blastocisti viene catturata e può aderire all'epitelio dell'endometrio (fase adesiva). L'adesione avviene in genere al 6° giorno ed è mediata da una serie di proteine e oligosaccaridi discussi nel paragrafo "Processi e molecole". La penetrazione nell'endometrio inizia al 7°-8° giorno (fase invasiva). Queste fasi dell'impianto sono controllate da specifiche citochine e fattori di crescita a cui pure si accennerà nel paragrafo "Processi e molecole". La ragione per la quale la madre non rigetta l'embrione impiantato, come ci si aspetterebbe dai concetti dell'immunologia, verrà invece discussa nel Capitolo 20.

## LA SECONDA SETTIMANA DI SVILUPPO

### Differenziamento del trofoblasto e della massa cellulare interna

Tra la fine della 1ª e l'inizio della 2ª settimana le cellule del trofoblasto adese all'epitelio dell'endometrio nella regione del polo embrionale iniziano a differenziarsi in due distinte popolazioni: il **citotroflobasto** e il **sinciziotrofoblasto** (Fig. 9-6). Quest'ultimo si forma a seguito della proliferazione e fusione delle cellule del citotrofoblasto. Il citotrofoblasto prolifera attivamente, mentre il sincizio non prolifera, ma si accresce per continua fusione di nuove cellule del citotrofoblasto. Le cellule della massa cellulare interna si differenziano in due lamine cellulari che formano un disco concavo-convesso (**disco germinativo bilaminare**): verso il citotrofoblasto l'**ectoderma primitivo** o **epiblasto** formato da un epitelio cilindrico pluristratificato e verso il blastocele l'**endoderma primitivo** o **ipoblasto** formato da un epitelio cubico monostratificato con cellule più piccole di quelle dell'epiblasto. Il sinciziotrofoblasto invade ed erode l'epitelio, le ghiandole e lo stroma dell'endometrio e penetra al suo interno fino a raggiungere ed erodere la parete dei vasi sanguigni materni. Questa attività del sincizio è dovuta alla produzione e secrezione di diversi enzimi tra cui metalloproteasi e urochinasi attivatore del plasminogeno. Il sangue materno così fuoriesce dai capillari e bagna i tessuti dell'embrione; intorno al 10° giorno la blastocisti è penetrata completamente nell'endometrio. Nel sito d'impianto al di sopra dell'embrione si forma un coagulo di sangue chiamato **tappo di chiusura**. Subito dopo la mucosa uterina si riforma sopra l'embrione impiantato (**mucosa capsulare**). Il differenziamento del trofoblasto in citotrofoblasto e sinciziotrofoblasto si è ora esteso a tutta la superficie dell'embrione. Nel sinciziotrofoblasto si formano dei piccoli **spazi** o **lacune sanguigne** che comunicano tra loro costituendo una sorta di labirinto. Il sangue materno proveniente dai vasi erosi riempie le lacune.

Alla fine della 2ª settimana il **sistema lacunare** del sinciziotrofoblasto è completamente formato. Nel citotrofoblasto proliferazioni cellulari colonnari costituiscono i **villi primari**. Si forma così una rudimentale placenta e allorché il sincizio raggiunge piccole arteriole e venule dell'endometrio, caratterizzate da un'adeguata differenza di pressione sanguigna, si instaura una prima circolazione utero-placentare in cui il sangue materno porta ossigeno e nutrimento all'embrione e rimuove i prodotti di rifiuto di questi.

Il sinciziotrofoblasto svolge anche un'importante funzione di ghiandola endocrina in quanto secerne nel sangue materno un ormone polipeptidico, l'**hCG** (**human chorionic gonadotropin**). L'hCG è simile all'LH (luteinizing hormone) e ha la funzione di inibire la regressione del corpo luteo e stimolare la sua trasformazione in **corpo luteo gravidico** (Fig. 9-5). In questo modo il corpo luteo continua a produrre la quantità di progesterone necessaria a sostenere l'endometrio e l'embrione impiantato. Come già riportato, a partire dalla 2ª settimana con opportuni test immunologici è possibile rilevare la presenza di hCG nelle urine della donna e quindi determinare il suo stato di gravidanza.

### La reazione deciduale

A partire dalle prime fasi dell'impianto le cellule della tonaca propria dell'endometrio vanno incontro ad una serie di modificazioni morfologiche e funzionali note come **reazione deciduale**. Tali modificazioni (11°-12° giorno) si estendono dal sito d'impianto a tutta l'area circostante, favoriscono la sopravvivenza dell'embrione, ma soprattutto ne arrestano la penetrazione nell'endometrio (vedi paragrafo "Processi e molecole" e il Capitolo 20).

### Formazione della primitiva cavità amniotica e del sacco vitellino primario

Intorno all'8°-9° giorno nella regione del polo embrionale le cellule dell'epiblasto, inizialmente strettamente accollate all'adiacente citotrofoblasto, cominciano a staccarsi da esso a causa della comparsa di una fessura piena di liquido da loro stesse secreto. Tale fessura si ingrandisce rapidamente e diviene la **cavità amniotica primitiva** (Figg. 9-6 e 9-7). Il tetto della cavità a ridosso del citotrofoblasto è delimitato da cellule provenienti dai margini del disco dell'epiblasto e chiamate ora **amnioblasti**, mentre il pavimento è formato dallo stesso epiblasto. In seguito gli amnioblasti formeranno la membrana amniotica che costituisce la parete dell'amnios. La membrana amniotica, la cavità da essa delimitata e il liquido che la riempie costituiscono l'**amnios** o sacco amniotico. L'amnios è uno dei **tre annessi embrionali** (amnios, sacco vitellino, corion) ed è destinato a racchiudere completamente l'embrione e a mantenerlo immerso in un ambiente liquido per tutta la gravidanza.

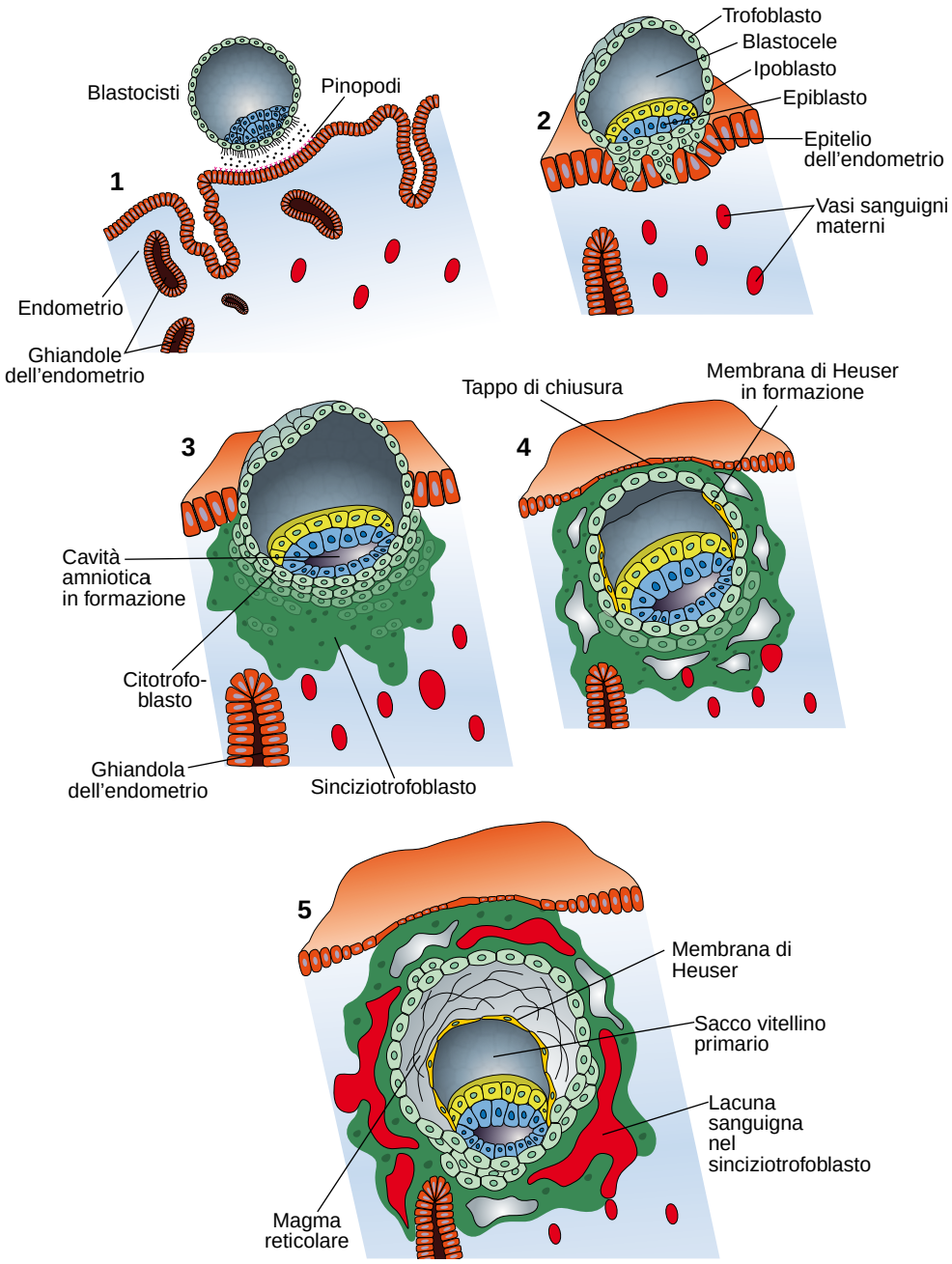



**Figura 9-6** ■ Fasi dell'impianto dell'embrione tra la fine della 1ª settimana e l'inizio della 2ª settimana. Notare la formazione del disco embrionale bilaminare (epiblasto ed ipoblasto), del citotrofoblasto e sinciziotrofoblasto, del sacco vitellino primario e l'abbozzo dell'amnios.

Contemporaneamente alla formazione della cavità amniotica primitiva, dai margini del disco dell'endoderma primitivo proliferano cellule che migrano al disotto del citotrofoblasto verso la regione opposta al polo embrionale (regione abembrionale). Tali cellule formano un sottile epitelio pavimentoso (che alcuni autori pensano originare non dall'endoderma primitivo, ma dal citotrofoblasto) chiamato **membrana di Heuser** (Fig. 9-6). La membrana di Heuser in continuazione con il disco dell'endoderma primitivo forma la parete del secondo annesso embrionale, il **sacco vitellino primitivo** la cui cavità ripiena di liquido comprende quasi tutto il precedente blastocele.

## Formazione del sacco vitellino secondario e del mesoderma extraembrionale

Tra il 10° e il 12° giorno tra la membrana di Heuser e il citotrofoblasto compaiono cellule di forma stellata, immerse in una matrice semifluida. Alcuni autori defini-

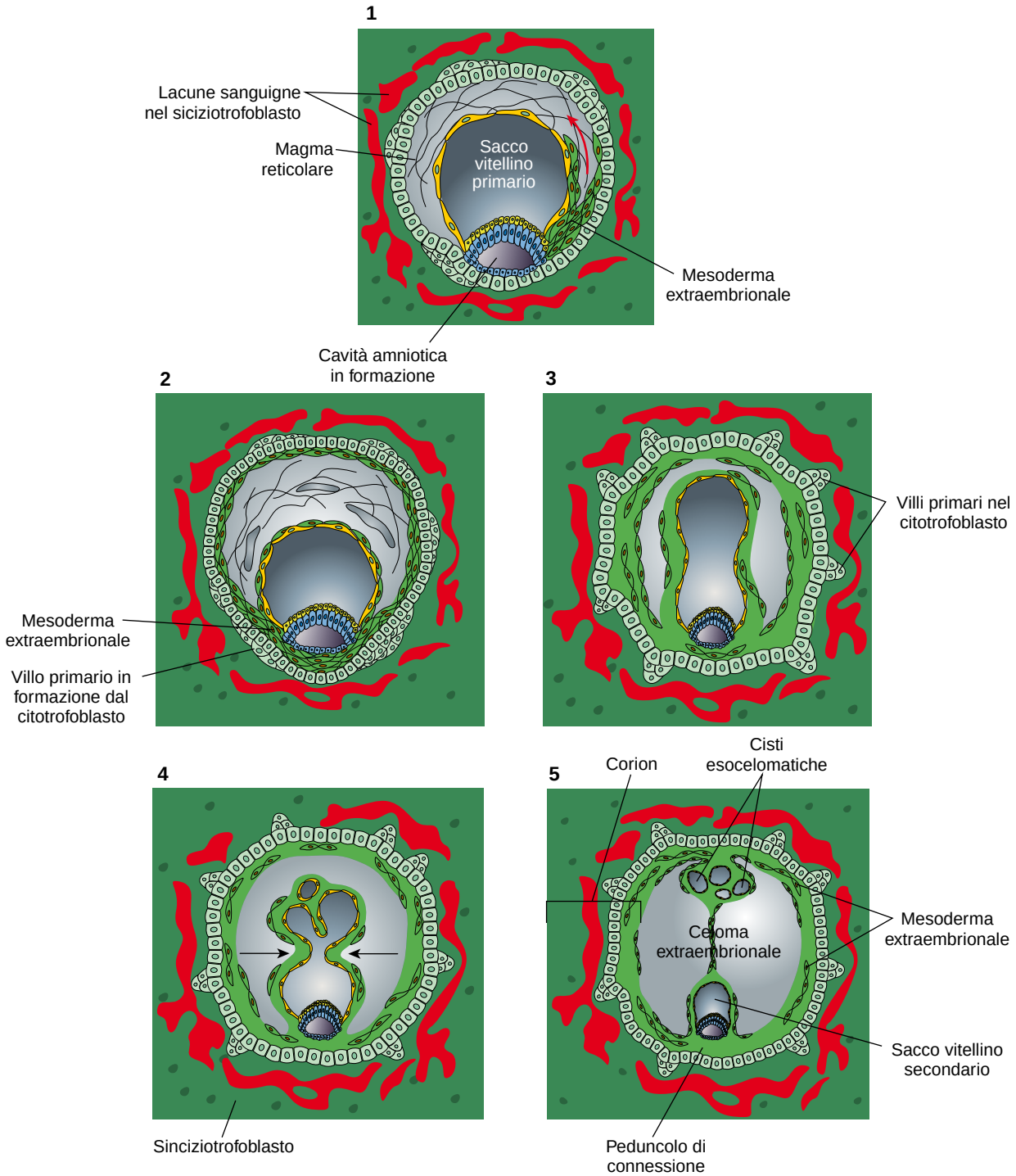



**Figura 9-7** ■ Cinque stadi dello sviluppo dell'embrione verso la fine della 2ª settimana. Notare la formazione del mesoderma extraembrionale, del sacco vitellino secondario e dei villi primari; l'insieme del sinciziotrofoblasto, del citotrofoblasto e del mesoderma extraembrionale al di sotto del citotrofoblasto (mesoderma extraembrionale somatopleurico) forma il corion nel quale si sviluppano i villi coriali da primari a terziari. Notare in 4 la compressione circolare (frecce) nella parete del sacco vitellino che porta alla formazione del sacco vitellino secondario e delle cisti.

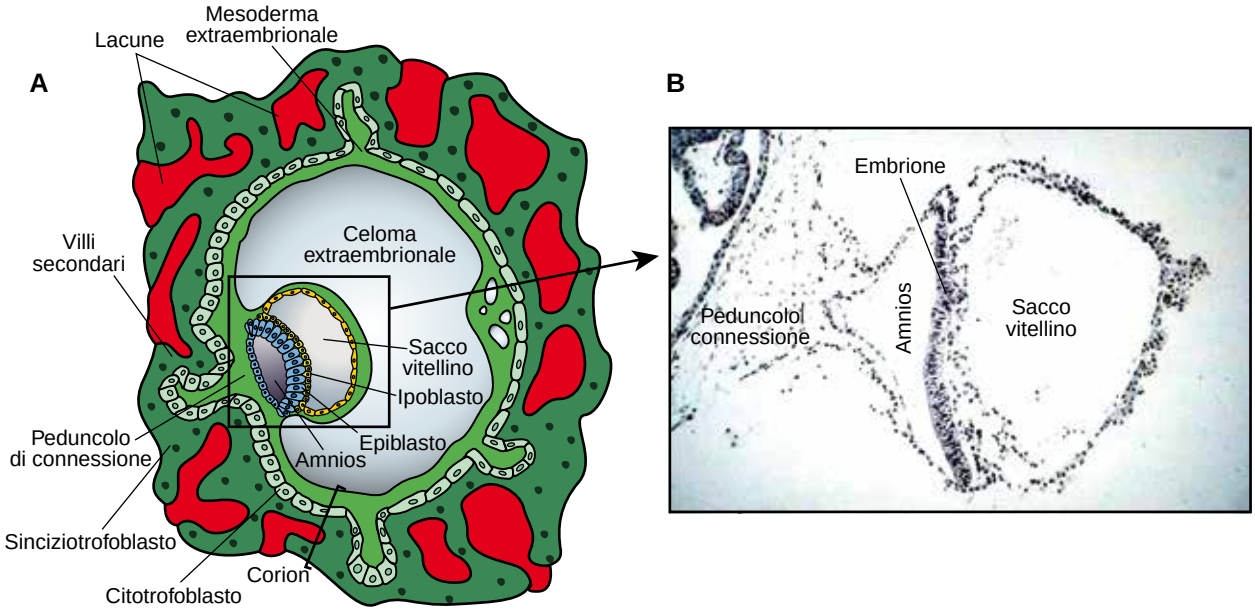



**Figura 9-8** ■ *A)* Schema dei tessuti e delle strutture di un embrione alla fine della 2ª settimana. *B)* Sezione di un embrione umano intorno al 15°-16° giorno di sviluppo, notare le diverse strutture raffigurate in *A*.

scono questo tessuto **mesoderma extraembrionale** o, per il suo aspetto, **magma reticolare** (Fig. 9-6). L'origine del mesoderma extraembrionale è incerta. Alcuni autori ritengono che esso origini dall'endoderma primitivo, altri dal citotrofoblasto ed altri ancora per migrazione di cellule dall'epiblasto. Parimenti incerto è il destino di tali cellule: alcuni ritengono che esse, addensandosi a ridosso del citotrofoblasto e della parete del sacco vitellino e dell'amnios, diano origine alle due lamine di mesoderma extraembrionale: la somatopleura e la splancnopleura extraembrionali. Altri autori ritengono che queste lamine derivino, alla fine della 2ª settimana, da una nuova migrazione di cellule, anche queste di incerta derivazione, che vanno a rivestire la membrana di Heuser esternamente e il citotrofoblasto verso l'interno (Fig. 9-7).

Secondo una delle ipotesi più accreditate il **sacco vitellino secondario** o **definitivo** si forma a seguito della rapida proliferazione delle cellule del mesoderma extraembrionale che si trovano al di sotto della membrana di Heuser. Queste effettuano una compressione circolare contro la membrana di Heuser nella regione equatoriale del sacco. A seguito di tale strozzatura il segmento inferiore del sacco finisce per staccarsi dal segmento superiore che rimane come sacco vitellino secondario. I resti del segmento inferiore si frammentano e formano vescicole o cisti (**cisti esocelomatiche**) che risultano distribuite a caso e asimmetricamente e sono destinate a riassorbirsi (Fig. 9-7). Si ritiene che il sacco vitellino secondario acquisti in seguito una nuova parete di cellule provenienti dall'endoderma primitivo che si dispongono al di sotto del mesoderma extraembrionale.

Alla fine della 2ª settimana il magma reticolare è quasi completamente scomparso e sostituito da una cavità ripiena di liquido, la **cavità celomatica extraembrionale**. Il mesoderma extraembrionale è ora ben definito e si trova a rivestire il sacco vitellino secondario, come **mesoderma extraembrionale splancnico** o **splancnopleura extraembrionale**, l'amnios, come **mesoderma extraembrionale somatico** o **somatopleura extraembrionale**, e il celoma extraembrionale al disotto del citotrofoblasto, come **mesoderma extraembrionale della lamina corionica**. Esso forma anche un cordoncino di cellule (il **peduncolo di connessione**) che tiene sospeso l'embrione nella cavità celomatica extraembrionale (Fig. 9-7). L'insieme del sinciziotrofoblasto e del citotrofoblasto rivestito internamente dal mesoderma extraembrionale è chiamato **corion**. Con la formazione del corion, la cavità celomatica extraembrionale è ora chiamata **cavità corionica**. Anche i villi primari acquistano una componente mesodermica e sono ora chiamati **villi coriali secondari**. In questo momento essi ricoprono l'intera superficie del corion.

## L'embrione alla fine della seconda settimana

Alla fine della 2ª settimana (Fig. 9-8) l'embrione è formato da un disco di cellule bilaminare biconcavo piuttosto allungato largo circa 0,1 mm e lungo circa 0,2 mm. Il disco si trova compreso tra l'amnios e il sacco vitellino. Il disco embrionale e i due annessi si trovano sospesi nel celoma extraembrionale mediante il peduncolo di connessione. Queste strutture sono contenute all'interno del corion o sfera corionica (diametro circa 4,5 mm) ripiena di liquido. Una rudimentale circolazione utero-corion-placentare si è stabilita (sangue materno nelle lacu-

ne, villi secondari coriali) e assicura il nutrimento dell'embrione per diffusione.

## PROCESSI E MOLECOLE

### *La riprogrammazione e l'attivazione del genoma dell'embrione*

Esperimenti condotti nel topo, hanno indicato che alla fecondazione il genoma paterno e materno subiscono estese **modificazioni epigenetiche** ad opera di enzimi presenti nel citoplasma dell'ovocito. Queste modifiche, dette epigenetiche in quanto "imposte sul DNA" e non riguardanti cambiamenti delle sequenze nucleotidiche del DNA, sono indispensabili per l'acquisizione della totipotenza differenziativa (capacità di dare origine a tutti i tipi di cellule dell'embrione) da parte dei blastomeri e per il successivo corretto sviluppo dell'embrione. Esse riguardano la conformazione della cromatina, la sintesi e/o metilazioni e acetilazioni di istoni e principalmente demetilazioni dello stesso DNA. Il primo ad essere modificato è il genoma paterno. Le protamine che mantengono la cromatina del nucleo dello spermatozoo in una forma fortemente condensata vengono eliminate e sostituite da nuovi istoni; il DNA viene quindi demetilato, probabilmente per rendere più accessibili alla trascrizione i geni dello sviluppo. Il genoma materno andrà incontro a simili modificazioni più gradualmente e solo nel corso delle prime divisioni dell'embrione. Allo stadio di 8-16 blastomeri il genoma paterno e materno mostrano uno stato di metilazione simile. In entrambi i genomi, tuttavia, la metilazione dei geni con *imprinting* stabilitasi durante la gametogenesi (vedi paragrafo "Processi e molecole" del Capitolo 8) permane, perché l'*imprinting* è anch'esso cruciale per lo sviluppo dell'embrione.

Le modificazioni dei genomi paterno e materno che avvengono dopo la fecondazione vengono indicate con il termine di **riprogrammazione genomica**. Soltanto il citoplasma dell'ovocito fecondato possiede la capacità di riprogrammare il genoma in modo che esso sia in grado di sostenere lo sviluppo embrionale. Come verrà spiegato più avanti, questa capacità è alla base degli esperimenti di clonazione nei quali il nucleo di una cellula differenziata di un individuo adulto viene trapiantato nel citoplasma dell'ovocito.

Fino allo stadio di due blastomeri nel topo e di 4-8 blastomeri nell'uomo, il genoma dell'embrione rimane silente (ovvero non trascrive i suoi geni) e le suddette modificazioni del genoma, nonché lo sviluppo iniziale dell'embrione, sono controllate da proteine già presenti nel citoplasma dell'ovocito alla fecondazione.

### *Inattivazione e attivazione del cromosoma X*

Durante i primi stadi dello sviluppo embrionale nell'embrione femminile XX uno dei due cromosomi X va incontro ad importanti cambiamenti. A differenza del cromosoma Y che contiene solamente pochi geni (circa 78 geni), il cromosoma X contiene circa 2000 geni essenziali per lo sviluppo e la stessa sopravvivenza della cellula. Tuttavia, due copie attive del cromosoma X risulterebbero deleterie. Per evitare questo sbilanciamento genico, nel sesso femminile avviene un particolare meccanismo di inattivazione di uno dei due cromosomi X. Difatti, è noto da tempo che nelle cellule somatiche XX di una donna adulta solamente uno dei cromosomi X è attivo geneticamente (contiene geni che possono essere trascritti), l'atro è quasi completamente inattivo. Nel 50% delle cellule è inattivo il cromosoma X paterno e nel 50% l'X materno. Come si vedrà nel Capitolo 16, gli ovociti fanno eccezione in quanto, in essi, entrambi i cromosomi X sono attivi. Nelle cellule somatiche, il cromosoma X inattivo si può identificare perché si trova sotto forma di **eterocromatina** o **corpo di Barr**, localizzabile anche nella cosiddetta bacchetta di tamburo del nucleo dei granulociti neutrofili.

Negli ultimi anni si è scoperto che nel corso delle prime fasi dello sviluppo embrionale i cromosomi X materno e paterno vanno incontro ad un singolare processo di inattivazione e riattivazione. In breve, come mostrato nella Figura 9-9, alla fecondazione nello zigote femminile, entrambe le X, sia la copia paterna che materna, sono

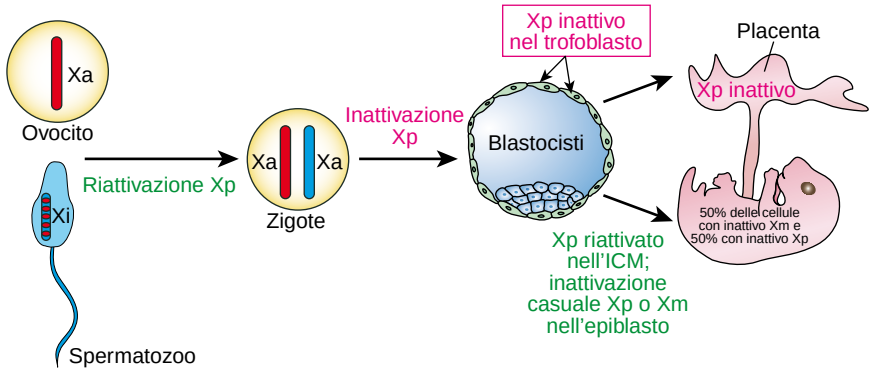



**Figura 9-9** ■ Schema delle fasi del processo di inattivazione e attivazione dei cromosomi X in un embrione femminile durante lo sviluppo embrionale preimpianto. Xa = X attivo; Xi = X inattivo; Xp = X paterno; Xm = X materno.

attive. Nelle prime segmentazioni, l'X paterno viene inattivato e questa inattivazione permane nelle cellule del trofoblasto e dei tessuti placentari di origine embrionale; nelle cellule della ICM avviene una riattivazione della X paterna. Poco dopo nell'epiblasto si verifica una nuova definitiva inattivazione di una delle X, ma stavolta a caso, ovvero nel 50% delle cellule è inattivato il cromosoma X paterno e nel 50% quello materno. Questa verrà mantenuta in tutte le cellule somatiche dell'embrione e dell'individuo adulto che come noto deriva dall'ICM.

Singolare è anche il meccanismo dell'inattivazione. Questo si basa sull'espressione di un gene chiamato ***Xist*** sito sullo stesso cromosoma X, che viene trascritto in un RNA che non viene tradotto in proteina. Questo RNA non codificante si lega al DNA del cromosoma X da inattivare e lo ricopre completamente.

L'inattivazione del cromosoma X ha un'importante conseguenza anche per quanto riguarda l'ereditarietà di patologie congenite dovute a geni siti sul cromosoma X. Una donna che riceve un cromosoma X dal padre o dalla madre che porta un gene mutato per un carattere recessivo non manifesterà alcun sintomo della patologia (portatore sano della patologia) in quanto l'allele sano del gene su uno dei cromosomi X compenserà l'alterata funzione o non funzione dell'allele mutato sito sull'altro cromosoma X. Un esempio di queste patologie dovute a geni legati al cromosoma X sono la distrofia muscolare di Duchenne e la sindrome di Simpson-Golabi-Behmel. Se il gene mutato è dominante, l'individuo manifesterà la patologia in modo attenuato.

## Efficienza del processo riproduttivo

In una coppia con fertilità normale che non attua alcun metodo contraccettivo e che si accoppi due volte alla settimana, la probabilità di fecondare un ovocito ad ogni accoppiamento è di circa il 50%. Poiché è stato calcolato che solo circa il 30-50% degli embrioni riesce ad impiantarsi normalmente, la probabilità che avvenga una gravidanza in un mese di accoppiamenti è di circa il 25%. Durante la durata della vita riproduttiva, una coppia che non pratica contraccezione potrebbe generare tra i 10 e i 20 figli.

È stato calcolato che solo circa il 30-50% degli embrioni normalmente concepiti riesce ad impiantarsi. La maggior parte degli embrioni che non si sviluppano è destinata a degenerare durante la 1ª settimana (aborto precoce), probabilmente per difetti nell'espressione di geni chiave dello sviluppo, senza che la donna si accorga di nulla. Sembra che l'embrione in condizioni di sviluppo sfavorevoli o in conseguenza di danni irreparabili a livello del DNA, sia in grado di attivare un programma di degenerazione che rientra nei meccanismi cosiddetti di **morte programmata cellulare** o **apoptosi**.

## Sviluppo embrionale a mosaico e regolativo

Fin dagli inizi dell'Embriologia sperimentale, alla fine del XIX secolo, si era osservato che durante lo sviluppo iniziale di embrioni di diverse specie di invertebrati, nel citoplasma dei blastomeri si distribuivano in modo diseguale sostanze in grado di dirigere il loro successivo differenziamento. Si sviluppò quindi il concetto che la capacità di un blastomero di dare origine a un determinato tipo cellulare dipendesse dalla presenza di **determinanti citoplasmatici**. Difatti se l'embrione veniva privato di alcuni blastomeri non si formavano determinati tessuti. Questi embrioni furono definiti a **sviluppo a mosaico**. In alcuni embrioni i determinanti sono già localizzabili in specifiche regioni dell'ovocito prima della fecondazione. L'esempio più evidente di questo fenomeno è costituito dal **plasma germinale**. Nella drosofila (moscerino dell'aceto), per esempio, il plasma germinale è localizzato al polo posteriore dell'ovocito, e viene distribuito a circa 15 cellule che si formeranno in questa regione dopo la fecondazione e che diventeranno cellule germinali primordiali (Fig. 9-10). Se il plasma germinale viene distrutto, si formeranno moscerini sterili perché privi di cellule germinali. Come spiegato in altre sezioni del libro, nei mammiferi non è presente il plasma germinale e le cellule germinali primordiali si formano a partire da cellule somatiche dell'epiblasto sotto l'azione di segnali molecolari provenienti dai tessuti circostanti. Gli embrioni in cui, durante le prime fasi dello sviluppo, i blastomeri non possiedono determinanti citoplasmatici e conservano la capacità di dare origine a qualsiasi tipo cellulare (totipotenza), sono detti a **sviluppo regolativo** (Fig. 9-11). In questi embrioni, della maggior parte dei vertebrati, la perdita di uno o più blastomeri può essere compensata da quelli rimanenti. In alcuni casi, se l'embrione viene dissociato in singoli o piccoli gruppi di blastomeri, questi possono dare origine ad un individuo completo (vedi paragrafi "La clonazione" e "I gemelli"). Il differenziamento cellulare negli embrioni regolativi inizia intorno allo stadio di morula. In questi embrioni il destino differenziativo dei blastomeri dipende da segnali molecolari che essi ricevono in una determinata regione dell'embrione e in un determinato momento dello sviluppo. In particolare

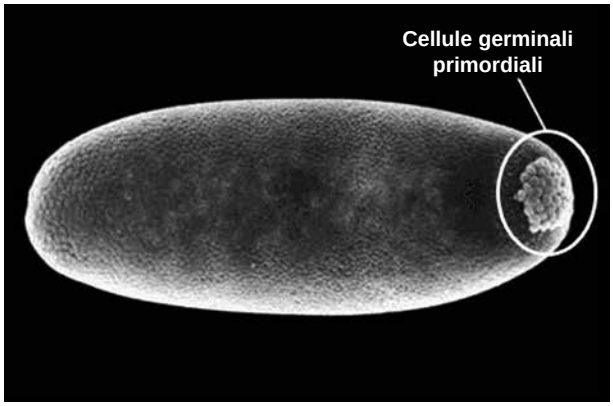



**Figura 9-10** ■ Fotografia al SEM di un embrione di Drosofila, con le cellule germinali primordiali al polo di destra. (*Da* F. Rudolf Turner, A.P. Mahowald, Scanning electron microscopy of *Drosophila* embryogenesis: the structure of the egg envelopes and the formation of the cellular blastoderm, Dev. Biol. 50, 95-108, 1976, con autorizzazione di Elsevier, modificata.)

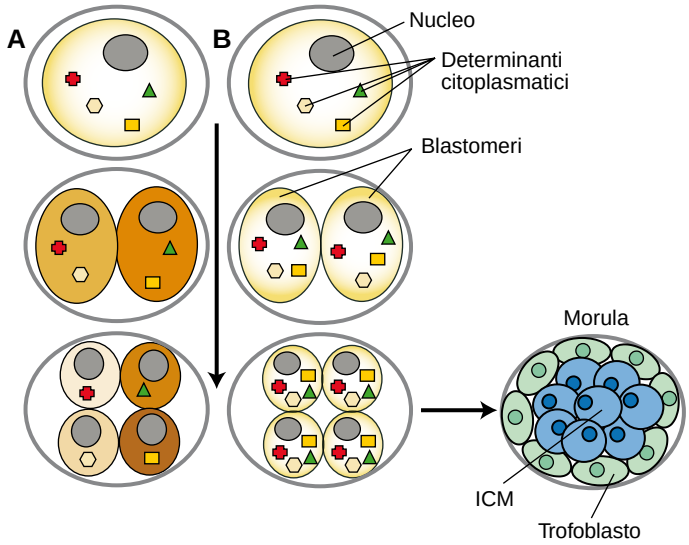



**Figura 9-11** ■ Sviluppo iniziale di un embrione a mosaico *(A)* o regolativo (*B*). Nel primo, determinanti citoplasmatici (specifiche proteine e RNA messaggeri) vengono distribuiti ai blastomeri in modo diseguale e ne determinano destini differenziativi diversi; nel secondo i blastomeri ricevono gli stessi determinanti e rimangono identici e totipotenti; solo in un secondo tempo (morula) essi ricevono segnali che ne determinano il differenziamento, le cellule interne in ICM e quelle esterne in trofoblasto.

le cellule più grandi che si trovano all'interno della morula daranno origine all'ICM, mentre quelle più piccole all'esterno daranno origine al trofoblasto. Più recentemente è stato proposto un terzo modello di sviluppo dell'embrione preimpianto chiamato **criptico** che è intermedio tra quello a mosaico e quello regolativo. Questo modello, avanzato nel topo da Graham nel 1971, suggerisce che il piano delle prime divisioni influenza la posizione che i blastomeri assumono nell'embrione preimpianto e di conseguenza il loro differenziamento. Secondo questo modello, elaborato successivamente da Surani e Barton nel 1984, sebbene entrambi i blastomeri allo stadio di 2 cellule possano contribuire alle cellule interne ed esterne della morula, allo stadio di blastocisti i blastomeri che derivano da quello dei due che si è diviso per primo sono destinati a dare origine alle cellule dell'ICM con una frequenza maggiore.

## La clonazione

La possibilità di generare individui identici, cioè cloni, ha sempre attratto l'interesse dei ricercatori. I primi studi che hanno posto le basi per la clonazione risalgono al 1936-1938 con gli esperimenti del grande embriologo Hans Spemann. In questi e in successivi esperimenti effettuati sugli anfibi, l'interesse dei ricercatori era rivolto a cercare di capire se il nucleo di cellule differenziate di individui adulti conservava, dopo il differenziamento in cellule dei vari tipi di tessuti, gli stessi geni presenti nell'ovocito fecondato. In altri termini, si cercava di comprendere se nuclei di cellule differenziate conservavano la capacità di dare origine a tutti i tipi cellulari presenti in un organismo adulto (totipotenza) così come è in grado di fare la prima cellula di un individuo (zigote). Quello che Spemann, e in seguito Briggs e King, Gurdon ed altri videro, è che durante lo sviluppo si verifica una riduzione progressiva della totipotenza. Tale riduzione delle potenzialità nucleari di una cellula durante il suo sviluppo poteva raramente essere revertita. Tuttavia, tra il 1958 e il 1970, Gurdon, trapiantando nuclei di cellule dell'intestino del girino di un anfibio, *Xenopus laevis*, in ovociti enucleati di una rana, riuscì ad ottenere rane adulte fertili (Fig. 9-12). Si appurò quindi che il nucleo di cellule differenziate poteva, seppure con difficoltà, essere "riprogrammato" a dare vita a tutti i tipi cellulari di un organismo. Per queste e altre ricerche pionieristiche, John Gurdon è stato insignito insieme a Shinya Yamanaka, che ne ha molto più tardi continuato le ricerche riprogrammando cellule somatiche di mammifero in cellule staminali totipotenti (vedi Capitolo 4), del premio Nobel per la medicina nel 2012. In quei primi tentativi, tuttavia, quando si provò a ripetere gli esperimenti di Gurdon sui mammiferi, si vide che il nucleo di cellule differenziate trapiantato in ovociti enucleati riusciva a supportare solo poche divisioni dell'embrione, che poi moriva. Il nucleo di cellule adulte di mammifero non sembrava quindi in grado di essere riprogrammato a produrre l'intera varietà di tipi cellulari presenti all'interno di un organismo adulto. Si assunse quindi che la clonazione dei mammiferi a partire da cellule adulte era impossibile e tale è rimasta la visione dei ricercatori fino al 1997. Tuttavia, in zootecnia, la clonazione di mammiferi a partire da cellule dell'embrione si era dimostrata fattibile tramite il metodo "embryo splitting" (dissociazione dell'embrione). In pratica si era visto che era possibile dissociare i blastomeri di embrioni di mammifero a stadi di sviluppo che precedono l'impianto nell'utero e inserirli in zone pellucide svuotate amplificando così il

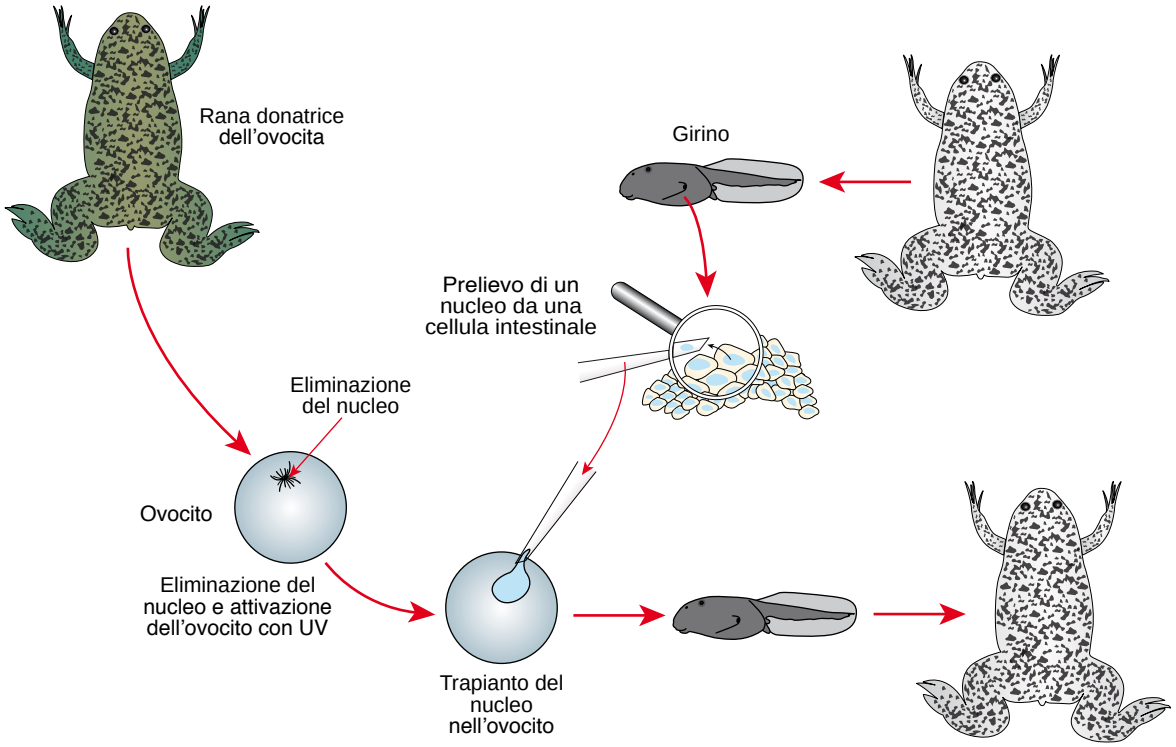



**Figura 9-12** ■ Un esperimento di John Gurdon. Il nucleo di una cellula dell'intestino di un girino di una rana albina trasferito nel citoplasma dell'ovocito di una rana di colore normale privato del suo nucleo, è in grado di dare origine ad una rana albina adulta, che è un clone del girino donatore del nucleo. UV = raggi ultravioletti.

numero di embrioni ottenuti. Questo metodo è correntemente utilizzato in zootecnia a partire dal 1979, quando Willadsen lo impiegò nella pecora. Nel 2000, Chan e coll. hanno utilizzato la tecnica dell'embryo splitting per clonare la scimmia Tetra. Come verrà spiegato più avanti, la formazione dei gemelli monozigotici avviene con un meccanismo di embryo splitting naturale. Nel 1981, Willadsen e collaboratori dimostrarono che era possibile clonare embrioni di pecora anche trasferendo nuclei di cellule embrionali e fetali in ovociti enucleati. Gli animali ottenuti con questa tecnica, chiamata **SCNT** (**somatic nuclear transfer**), e con l'embryo splitting sono geneticamente identici fra loro, ma non al genitore, in quanto derivano da un ovocito fecondato da uno spermatozoo che ha dato origine a più embrioni. Pertanto il loro genoma è il risultato del rimescolamento del patrimonio genetico dei due genitori durante la fecondazione. Nel 1997, gli scienziati del Roslin Institute del gruppo di Ian Wilmut, con la nascita della pecora Dolly, sono stati i primi a sfatare il dogma dell'impossibilità di ottenere cloni di mammiferi partendo dal nucleo di cellule adulte. Essi hanno utilizzato cellule prelevate dalla ghiandola mammaria di una pecora Dorset (bianca) gravida, le hanno messe in coltura e le hanno indotte in una fase di quiescenza in cui non si dividevano più. Queste cellule sono poi state iniettate nello spazio perivitellino (al di sotto della zona pellucida) di ovociti enucleati prelevati da pecore Blackface (con il muso nero). Tramite uno stimolo elettrico una cellula è stata fusa con l'ovocito donando il suo nucleo. L'ovocito, attivato partenogeneticamente dalla scarica elettrica e trasferito in una madre adottiva, ha dato origine ad un embrione. Su quasi 300 embrioni così prodotti uno solo ha dato origine a Dolly, una pecora Dorset con genoma nucleare identico a quello della madre (Fig. 9-13). Dolly è vissuta sei anni ed è morta per una malattia polmonare nel 2003.

Dalla **clonazione** di Dolly si sono susseguite notizie di clonazione in diverse specie di mammifero come il topo, il cane, il gatto e perfino l'uomo. Tra il 2004 e il 2005, lo scienziato coreano Woo Suk Hwang è stato il primo a riferire di aver prodotto blastocisti e cellule ES umane con un metodo di SCNT simile a quello utilizzato per Dolly. I risultati di Hwang sono stati, tuttavia, successivamente smentiti. Nel febbraio 2009, un gruppo di ricercatori guidati dall'americano Robert Lanza ha di nuovo pubblicato di aver prodotto, solo a scopo di ricerca, blastocisti umane con il metodo SCNT (Chung e coll., 2009). Gli esperimenti di Shinya Yamanaka, già citati sopra e descritti nel Capitolo 4, e il recentissimo lavoro (2013) del gruppo di Shoukhrat Mitailipov sulla produzione di cellule ES umane con il metodo SCNT hanno definitivamente confermato la possibilità di riprogrammare il nucleo di una cellula differenziata di mammifero in modo da fargli riacquistare una completa capacità differenziativo.

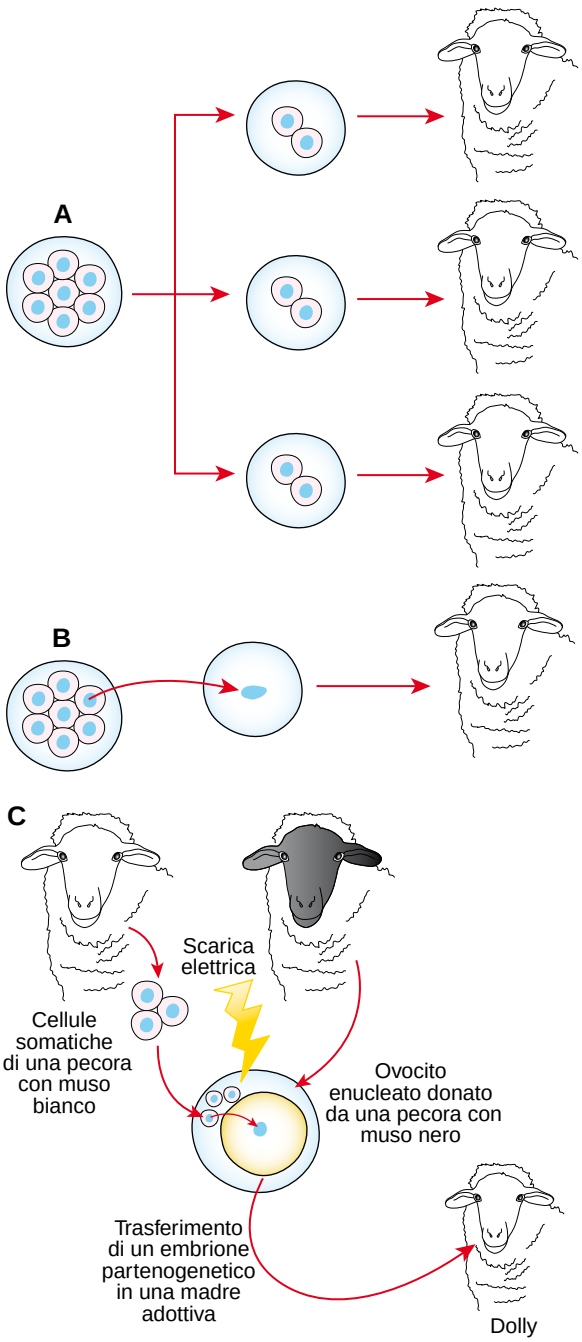



**Figura 9-13** ■ Tre metodi di clonazione nei mammiferi. *A)* Separazione di cellule dell'embrione preimpianto (fino allo stadio di 8 cellule). *B)* Trasferimento di un nucleo di una cellula di un embrione preimpianto nel citoplasma di un ovocito privato del suo nucleo e fatto sviluppare in un adulto. *C)* Trasferimento di un nucleo di una cellula di un tessuto differenziato di un individuo adulto nel citoplasma di un ovocito privato del suo nucleo e fatto sviluppare in un adulto. Quest'ultimo metodo è stato utilizzato per produrre la pecora Dolly.

## Le cellule staminali embrionali

Come descritto nel Capitolo 4, nel 1981 due gruppi di ricercatori inglesi, Evans e Kaufman e Martin, riuscirono a produrre dalle cellule dalla massa cellulare interna della blastocisti del topo cellule che in coltura erano in grado di dividersi continuamente rimanendo indifferenziate (capacità di autorinnovamento) e che modificando certe condizioni di coltura potevano differenziare in tipi cellulari diversi (ad esempio cellule muscolari, neuroni e cellule del sangue) (pluripotenza). Queste cellule furono chiamate **cellule staminali embrionali** o semplicemente **cellule ESC** (embryonal stem cells). Quando iniettate in blastocisti, le cellule ES si dimostrarono in grado di contribuire alla formazione di tutti i tessuti dell'embrione, comprese le cellule germinali (Fig. 9-14). Nel 1998, cellule ES sono state prodotte da embrioni umani. Grazie alle loro straordinarie proprietà le cellule ES vengono utilizzate per studiare molti aspetti dello sviluppo embrionale e del differenziamento cellulare. Oggi le cellule ES cominciano ad essere impiegate in via sperimentale per formare tessuti che possono essere utilizzati per curare alcune gravi patologie. In Italia, a seguito della legge 40 del 2004, la sperimentazione sulle cellule staminali umane è vietata.

Per un'ampia trattazione sui vari tipi di cellule staminali e le loro caratteristiche si rimanda al Capitolo 2.

## Le chimere

La formazione delle cosiddette **chimere** è una chiara dimostrazione delle proprietà regolative dell'embrione di mammifero. La chimera si forma allorché le cellule di un embrione si mescolano con quelle di un altro embrione della stessa o di specie diversa ovvero quando cellule di diversa natura vengono iniettate o mescolate con cellule di un embrione prima dell'impianto. In casi molto rari la formazione delle chimere può avvenire spontaneamente per la fusione di due zigoti o il mescolamento di cellule di due embrioni che si trovino molto vicini negli stadi iniziali di sviluppo. Un certo grado di chimerismo può verificarsi anche a seguito di trasferimento di cellule del sangue tra due gemelli eterozigoti. Più comunemente le chimere possono essere create in laboratorio utilizzando fondamentalmente due metodi (Fig. 9-15): mescolando blastomeri di due diversi embrioni allo stadio di 4-8 cellule o, come abbiamo visto nel Capitolo 1, iniettando cellule staminali nella blastocisti. Il primo topo chimerico fu generato da Krzysztof A. Tarkowski e Beatrice Mintz nel 1960, mentre l'iniezione di cellule nella blastocisti fu messa a punto da Richard Gardner e Ralph Brinster verso la fine degli anni '60. Come illustrato nei Capitoli 1 e 4, le cellule ES iniettate in una blastocisti possono contribuire allo sviluppo di tutti i tipi cellulari della chimera, comprese le cellule germinali. L'utilizzo dei topi chimerici ha fornito importanti informazioni su diversi aspetti dello sviluppo embrionale e in particolare, dopo lo sviluppo delle metodologie di introduzione di geni nelle cellule staminali embrionali in coltura, ha fortemente favorito la produzione di topi transgenici.

## Meccanismi molecolari dell'impianto iniziale

La blastocisti fuoriuscita dalla zona pellucida dopo la fase di apposizione deve aderire all'epitelio dell'endome-

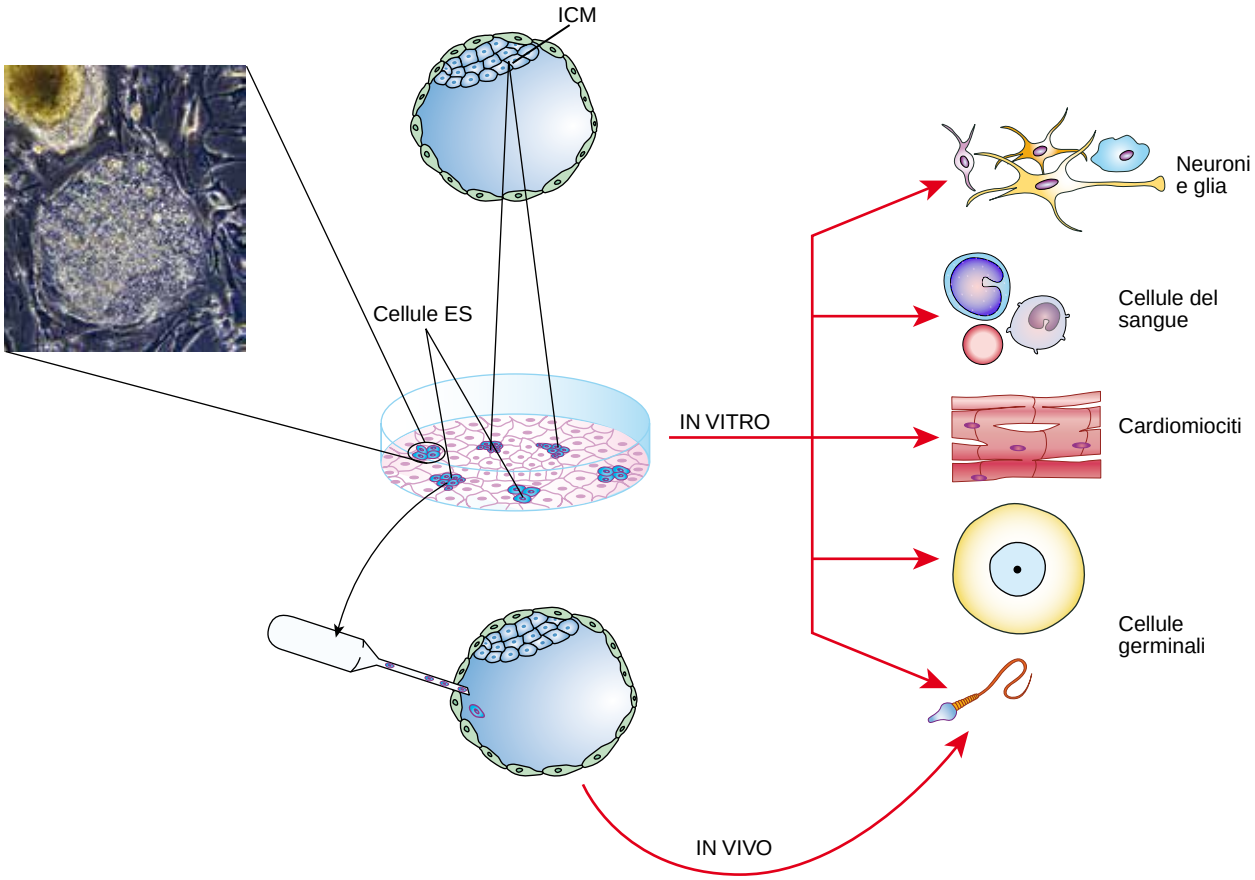



**FIGURA 9-14** ■ A sinistra, una colonia di cellule ES umane. A destra, schema della formazione di cellule ES dall'ICM di una blastocisti e le due principali applicazioni delle cellule ES: iniezione in una blastocisti per partecipare alla formazione di tutti i tessuti dell'embrione e formazione di cellule e tessuti in coltura.

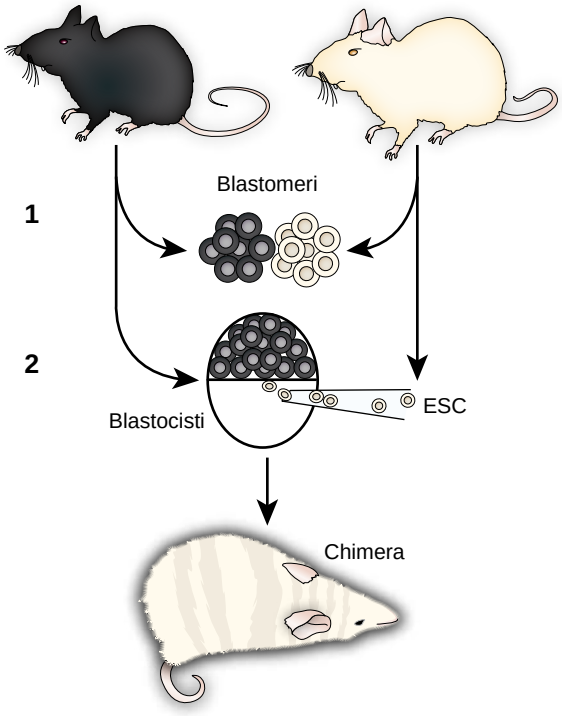



**FIGURA 9-15** ■ Formazione di un topo chimerico mediante il metodo dell'aggregazione di blastomeri (1) o dell'iniezione di ESC in una blastocisti (2). Nel metodo (1), i blastomeri vengono prelevati da un embrione di una madre del ceppo C57/6J a manto nero e da un embrione di una madre FVB/NJ a manto bianco. Nel metodo (2) la blastocisti proviene da un embrione C57/6J e le ESC da un embrione FVB/NJ. Notare il manto pezzato del topo chimerico che nasce dalle due procedure; si dimostra che tutti i tessuti della chimera possiedono cellule che derivano sia dal ceppo C57/6J che FVB/NJ.

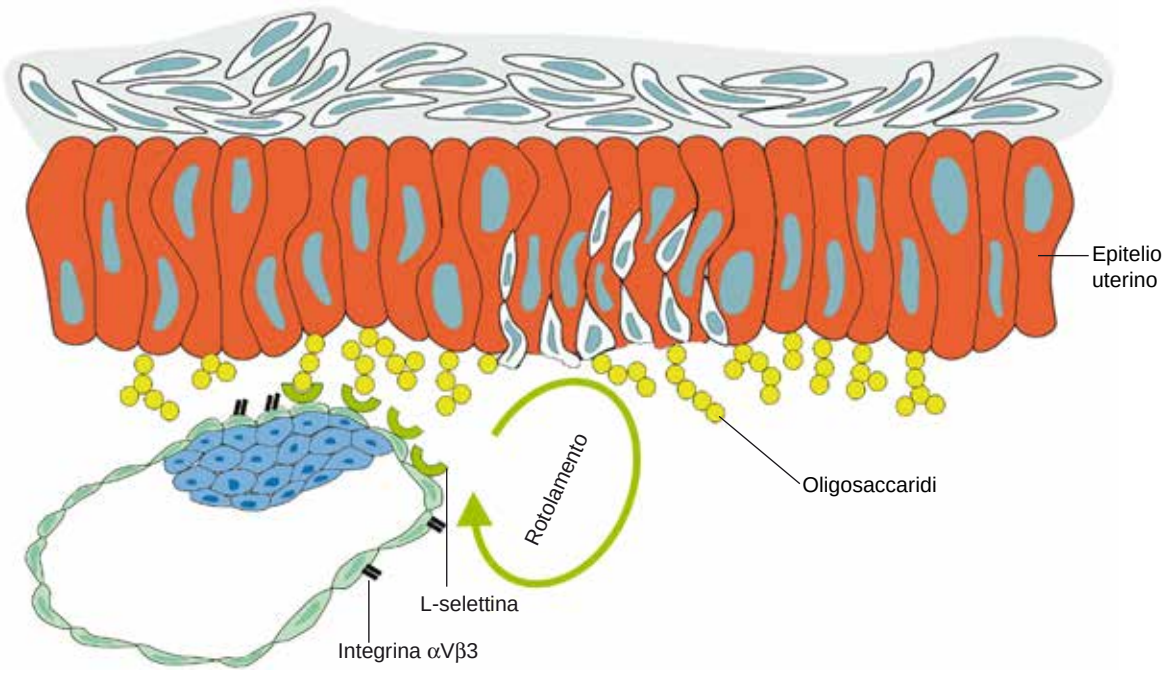



**Figura 9-16** ■ Adesione della blastocisti all'epitelio dell'utero mediante selettine e integrine.

trio. Nell'uomo l'adesione avviene dalla parte del polo embrionale, ma cosa orienti la blastocisti non è noto. In analogia ai meccanismi che presiedono all'adesione e al passaggio dei leucociti attraverso l'endotelio dei capillari, sembra che la blastocisti rotoli lentamente sull'epitelio e si arresti grazie all'interazione tra proteine adesive espresse dalle cellule del trofoblasto chiamate **L-selettine** e zuccheri (oligosaccaridi) che ricoprono la superficie delle cellule uterine. Questa prima interazione è seguita da altre che stabilizzano e rinforzano l'adesione e che coinvolgono diverse citochine e fattori di crescita, che svolgono un ruolo importante nell'impianto, anche se le loro specifiche funzioni rimangono in gran parte da identificare. Per esempio numerosi studi nel topo hanno indicato che il **LIF** (**leukemia inhibitory factor**) è una citochina indispensabile all'impianto. Essa viene prodotta dalle cellule epiteliali e agisce sul trofoblasto che possiede recettori per questa citochina. Anche nell'uomo alcuni studi hanno associato certe forme di infertilità della donna, in cui la paziente non è in grado di portare avanti una gravidanza, ad una bassa produzione di LIF da parte dell'endometrio. La funzione del LIF è a tutt'oggi sconosciuta, anche se si ipotizza un suo ruolo anti-apoptotico che favorirebbe la sopravvivenza della blastocisti. Altre evidenze suggeriscono che **citochine della famiglia delle CXC** (cysteine-X-cysteine) potrebbero attrarre la blastocisti nel sito di impianto, mentre un secondo tipo di molecole adesive, quali le **Integrine** (in particolare l'integrina $\alpha v\beta 3$), espresse dal trofoblasto, stabilizzerebbero l'adesione delle blastocisti all'endometrio (Fig. 9-16). Altre molecole espresse sulla superficie del trofoblasto polare come il **Perlecano** (un proteoglicano) e il **recettore per l'EGF**, ovvero EGF-R (epidermal growth factor receptor), partecipano all'adesione; quest'ultimo legando la proteina HB-EGF-like (heparin-binding EGF-like) presente sulla membrana delle cellule uterine.

Numerose cellule del sistema immunitario sono presenti nell'endometrio e svolgono un ruolo cruciale nell'impianto; la loro azione deve essere in qualche modo inibita per impedire il rigetto dell'embrione. I meccanismi responsabili di questa inibizione saranno discussi nel Capitolo 20.

## La reazione deciduale

Come abbiamo visto nella parte generale di questo capitolo, la **reazione deciduale** è un insieme di modificazioni morfologiche e molecolari che si verificano nell'endometrio durante l'annidamento dell'embrione. A tali modificazioni si possono attribuire tre funzioni principali: la prima è quella di creare intorno all'embrione un microambiente nutritivo che lo sostenga prima dell'instaurarsi della placenta primitiva; la seconda è di arrestare l'attività di erosione dei tessuti del sinciziotrofoblasto; una terza probabile funzione della reazione è quella di creare un microambiente che protegga l'embrione dal rigetto. Morfologicamente la reazione deciduale consiste in modificazioni delle cellule connettivali (i fibroblasti della mucosa uterina proliferano, aumentano di volume, idratandosi, riempiendosi di glucidi, proteine e lipidi e assumendo un'organizzazione epitelioide), dei vasi, della matrice intercellulare e nel reclutamento di globuli bianchi, in particolare di particolari linfociti NK, che ricor-

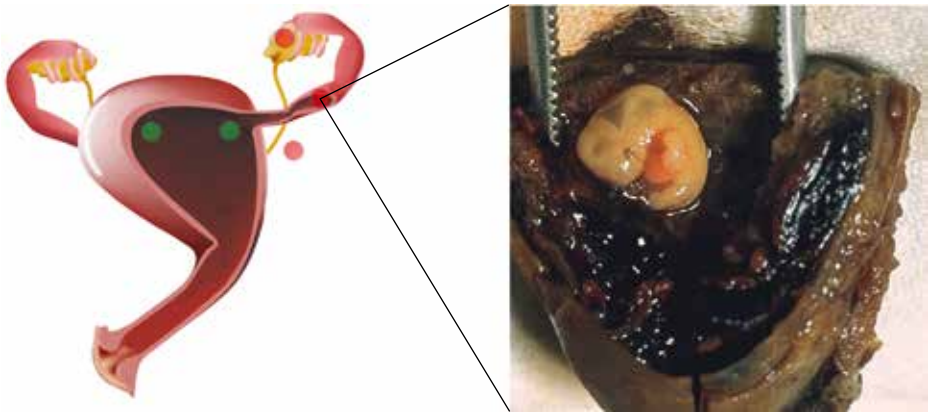


**FIGURA 9-17** ■ Siti d'impianto normali nell'utero (aree verdi) e siti ectopici extrauterini (aree rosse). A destra, un embrione di circa 4 settimane impiantato nella tuba (*da* CDC/Dr. Edwin P. Ewing, Jr.).

dano quelle dei processi infiammatori. Queste modificazioni sono regolate da ormoni (progesterone ed estrogeni) e da interazioni delle cellule del trofoblasto con le cellule epiteliali e connettivali dell'endometrio. L'attivazione nelle cellule epiteliali e connettivali dell'enzima **COX-2** (cyclooxygenase-2), necessario alla sintesi di prostaglandine e prostacicline, è uno degli eventi molecolari più importanti della reazione. Le prostaglandine, una particolare classe di lipidi, sembrano infatti essere le molecole principali responsabili dei processi di decidualizzazione. Per quanto riguarda l'immunotolleranza della madre verso l'embrione, numerosi sono i fattori implicati. Tra questi l'attività di linfociti NK e la produzione di molecole immunosoppressive chiamate DSFs (decidual suppressive factors), probabilmente prodotte da linfociti Treg presenti nella decidua. Alcuni di questi fattori sono probabilmente responsabili anche delle proprietà antimetastatiche della decidua, necessarie per bloccare l'invasione del sinciziotrofoblasto. Queste sono in parte dovute anche alla produzione di inibitori delle metalloproteasi e di urochinasi attivatore del plasminogeno che, come riportato sopra, sono le principali proteasi dell'impianto.

I meccanismi molecolari della reazione deciduale e dell'immunità della placenta saranno discussi in modo più approfondito nel Capitolo 20.

## ASPETTI CLINICI

### *La pillola del giorno dopo*

Esistono due tipi di pillola contraccettiva cosiddetta "del giorno dopo". Il primo tipo, chiamato RU-486, contiene una molecola lipidica sintetica (uno steroide) che inibisce l'azione del progesterone sull'utero competendo con i suoi siti di legame ed impedendo l'impianto dell'embrione, se presa entro tre giorni da un rapporto sessuale o l'aborto dell'embrione se presa (in genere insieme a prostaglandine) entro tre mesi dal rapporto. Il secondo tipo di pillola, più recentemente messa in commercio, anche chiamata pillola contraccettiva di emergenza (ECP, emergency contraceptive pill) contiene delle dosi di progestinici ed estrogeni sintetici che somministrati entro tre giorni da un rapporto sessuale inibiscono l'impianto dell'embrione in circa il 70-80% dei casi agendo sulla mucosa uterina.

### *Impianto ectopico*

L'impianto è considerato normale se avviene nella parte alta del corpo dell'utero sia nella faccia anteriore (45,5%) che in quella posteriore (55,5%). In circa l'1% delle gravidanze l'impianto avviene al di fuori dell'utero e si parla quindi di **impianti extrauterini** o **ectopici** (Fig. 9-17). A seconda delle sedi, la gravidanza extrauterina viene definita: tubarica (che è a sua volta distinguibile in interstiziale, istmica, ampollare e fimbrica, in base alla porzione della tuba in cui si ha l'annidamento dell'embrione), tubo-ovarica, ovarica o addominale (in quest'ultimo caso, l'impianto dell'embrione avviene nella cavità peritoneale o a livello degli organi addominali). Il 98% delle gravidanze ectopiche avviene nelle tube. Le cause sono in gran parte sconosciute, ma un malfunzionamento del battito delle ciglia dell'epitelio tubarico, infiammazioni della pelvi e ovviamente l'occlusione delle tube possono essere tra le cause di questa patologia.

### *La mola idatiforme*

Nella **mola idatiforme,** o **idatidiforme**, il trofoblasto prolifera in modo incontrollato, mentre l'ICM non si sviluppa. Si tratta in pratica di un tumore del trofoblasto (Fig. 9-18A). Il corioadenoma (mola non invasiva) è un'invasione locale del miometrio da parte della mola idatiforme. Il coriocarcinoma è un tumore molto invasivo, di solito metastatico, composto da cellule trofoblastiche maligne. La localizzazione placentare del tumore trofoblastico, consistente di cellule trofoblastiche intermedie che persistono dopo una gravidanza a termine, è rara. La mola idatiforme è più comune dopo gravidanze

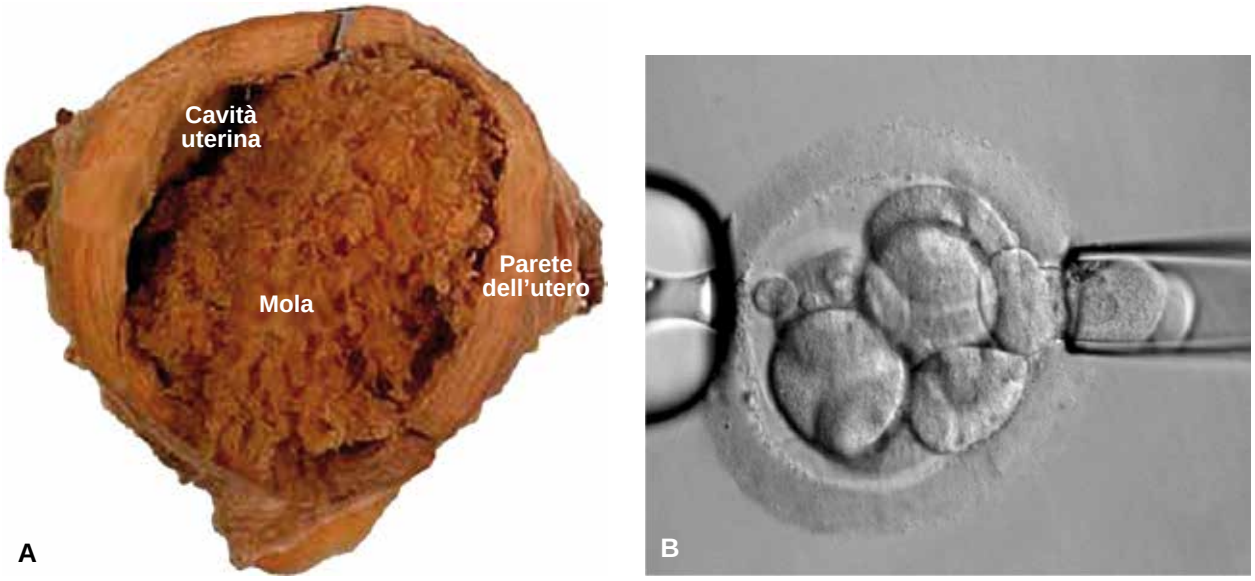



**Figura 9-18** ■ *A)* Mola idatiforme nella cavità uterina (*da* http://www.health.act.gov.au, per gentile concessione di ACT Health e ACT Pathology). *B)* Prelievo di un blastomero da una morula, eseguito per una diagnosi preimpianto.

in pazienti molto giovani (<17 anni) o anziane (trentenni e quarantenni) e si verifica in circa 1 ogni 2.000 gravidanze. Più dell'80% delle mole è benigno e regredisce spontaneamente. Tuttavia, il 15-20% tende a persistere e il 2-3% è seguito da un coriocarcinoma (in circa 1 ogni 25.000-45.000 gravidanze). L'analisi citogenetica delle cellule del coriocarcinoma ha mostrato che esse possiedono quasi sempre cromosomi esclusivamente paterni, mentre le cellule del corioadenoma sono generalmente triploidi, per la presenza di due set di cromosomi paterni e uno materno. Si pensa che le moli originino dalla fecondazione anomala di un ovocito che porta ad uno squilibrio dell'imprinting (vedi paragrafo precedente) con conseguente sviluppo abnorme del trofoblasto. Questa anomala fecondazione può avvenire principalmente in due modi: due spermatozoi possono fecondare un ovocito che manca del suo nucleo o che lo perde subito dopo o, dopo la fecondazione, il numero di cromosomi paterni può raddoppiare per endomitosi, con o senza perdita del pronucleo materno. La presenza del set di cromosomi materni impedisce dunque la trasformazione carcinomatosa, invasiva, della mola.

## *Diagnosi genetica preimpianto*

Con l'evolversi delle tecniche di fecondazione in vitro, la **diagnosi genetica preimpianto** (preimplantation genetic diagnosis, PGD) si è proposta come una nuova metodologia di diagnosi prenatale intesa ad identificare, prima dell'impianto in utero, la presenza di malattie genetiche nell'embrione generato in vitro da coppie ad elevato rischio riproduttivo. La possibilità di diagnosticare una malattia genetica nell'embrione, prima dell'impianto, evita il ricorso all'interruzione di gravidanza terapeutica, spesso devastante dal punto di vista psicologico e non sempre accettata dal punto di vista etico/morale. I pazienti che richiedono la PGD vengono sottoposti alle procedure di IVF per permettere la manipolazione dell'embrione tre giorni dopo la fecondazione, prima del suo impianto in utero. È importante ottenere dal ciclo IVF un adeguato numero di embrioni al fine di aumentare le probabilità di identificarne almeno uno o due che all'analisi genetica risultino privi della specifica malattia ricercata. Uno o due blastomeri vengono rimossi da un embrione (Fig. 9-18B) e sottoposti ad analisi genetica; se i blastomeri prelevati risulteranno non affetti dalla malattia, l'embrione potrà essere trasferito nell'utero della madre, ottenendo così una gravidanza esente dalla specifica malattia. Lo sviluppo delle conoscenze sul genoma umano, con l'identificazione di nuovi geni coinvolti nell'insorgenza di malattie ereditarie, unitamente all'avanzamento della tecnologia strumentale, ha notevolmente esteso il campo di applicazione della PGD. Dal primo caso di PGD di fibrosi cistica eseguito nel 1992, le strategie diagnostiche si sono evolute notevolmente, e di conseguenza si è avuta una consistente crescita del numero di malattie alle quali è stata applicata la PGD. Ad oggi esistono protocolli diagnostici per oltre 300 malattie monogeniche, autosomiche dominanti, recessive o legate al cromosoma X. In Italia la legge 40 del 2004, vieta la PGD. Questa può essere effettuata, tuttavia, sul primo globulo polare dell'ovocito (vedi Capitolo 7). Naturalmente la PGD sul globulo polare rivela anomalie genetiche portate solamente dalla madre. Come illustrato nel Capitolo 3, la diagnosi prenatale sui villi coriali, il liquido amniotico o il sangue del cordone ombelicale è invece permessa e anzi consigliata per le gravidanze in donne dopo i 40 anni di età.

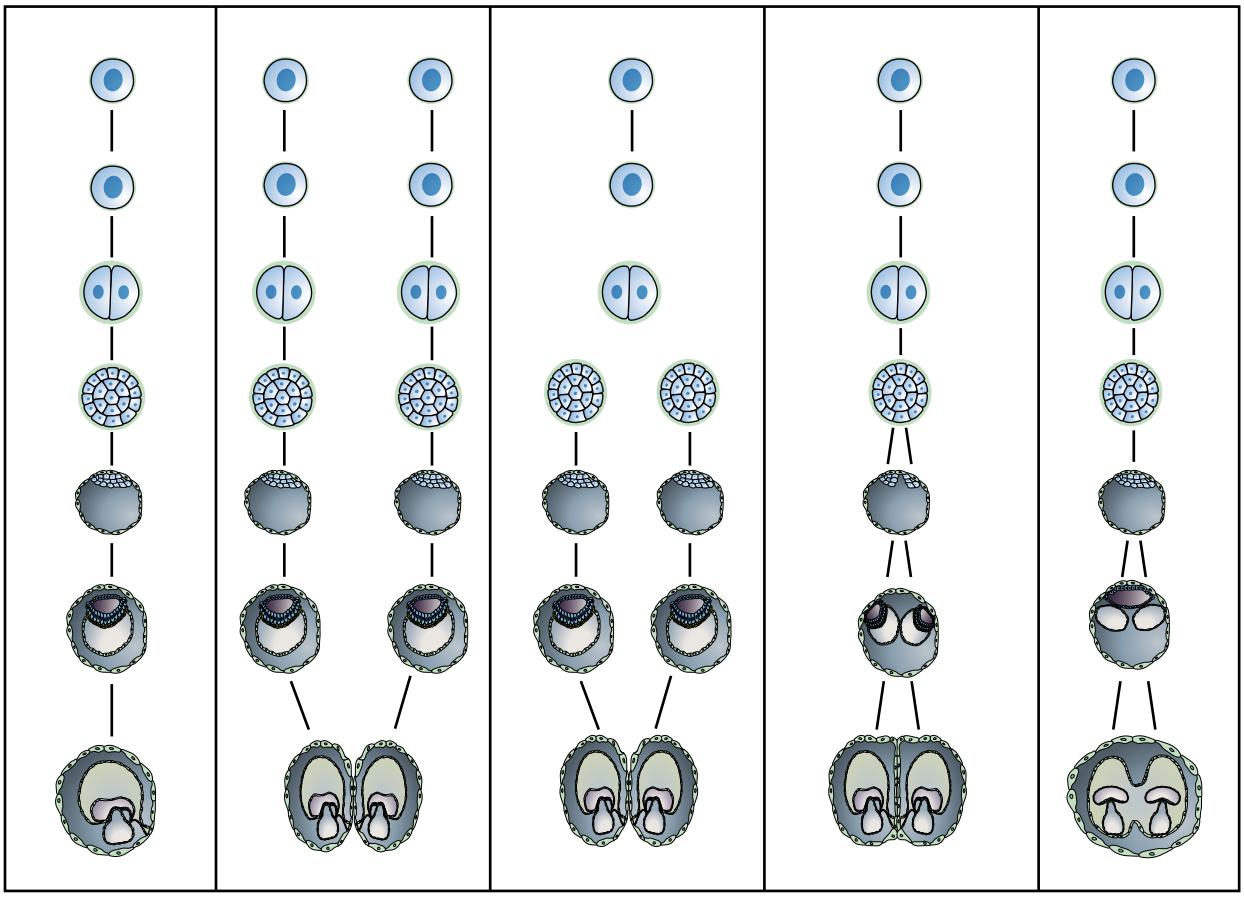


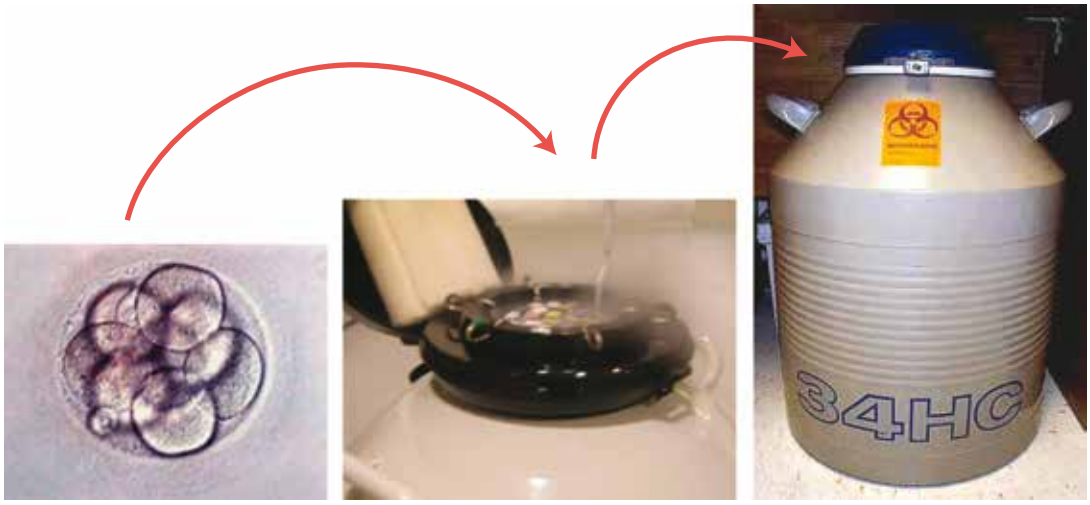
**Figura 9-19** ■ Diversi tipi di gemelli, da sinistra a destra: gravidanza normale unica, gemelli dizigoti (gemelli falsi), gemelli monozigoti (gemelli veri) ognuno con annessi embrionali, corion e amnios, propri (bicoriali e biamniotici), gemelli monozigoti con un solo corion, ma con proprio amnios (monocoriali e biamniotici), gemelli monozigoti con un solo corion e un solo amnios (monocoriali e monoamniotici).

## *Test di gravidanza*

Alcuni anni fa venne proposto un test di gravidanza precoce basato sulla determinazione della presenza nel sangue di un fattore chiamato EPF (early pregnancy factor). Si tratterebbe di una proteina ad azione immunosoppressiva prodotta dall'ovaio stimolato da un fattore non ancora ben caratterizzato prodotto dallo zigote rivelabile già dopo 24-48 ore dalla fecondazione. Il test, tuttavia, è costoso, piuttosto lungo e soggetto a risultati non sempre attendibili, tanto che è stato praticamente abbandonato. Un test più sensibile e sicuramente attendibile, acquistabile oggi nelle farmacie, è quello basato sulla determinazione immunologica della presenza dell'ormone **hCG** nel sangue o nell'urina della donna gravida. La proteina hCG comincia ad essere prodotta in concentrazioni rilevabili dal trofoblasto durante l'impianto, tra il 6° e il 12° giorno dalla fecondazione.

## *I gemelli*

Circa l'1% delle gravidanze si risolve con un parto gemellare. Si distinguono due categorie di gemelli: i **gemelli dizigoti** (o falsi gemelli), circa 70%, e i **gemelli monozigoti** (o veri gemelli), circa il 30% (Fig. 9-19). I primi provengono dalla fecondazione di due o più ovociti distinti: ogni ovocito fecondato da un diverso spermatozoo si svilupperà in un individuo; naturalmente in questo caso gli individui possono essere di sesso diverso e si assomigliano come due normali fratelli. A seguito delle metodologie di superovulazione utilizzate nelle tecniche di fecondazione assistita, i parti plurigemellari sono divenuti più frequenti. I gemelli monozigoti, invece provengono da un unico ovocito fecondato. Nel corso delle prime fasi di sviluppo lo zigote si divide in blastomeri scarsamente adesi tra loro che conservano la potenzialità, qualora si separino singolarmente o in piccoli gruppi, di formare un individuo completo. Questi gemelli hanno lo stesso corredo genico e quindi sono sempre dello stesso sesso e hanno le stesse sembianze: sono sostanzialmente cloni dello stesso individuo. A seconda del momento in cui si verifica tale separazione (le cui cause non sono note), i gemelli omozigoti avranno alcuni annessi embrionali (corion e/o amnios) separati, parzialmente in comune o in comune. Quando la separazio-




Embrione a 8 cellule | Congelamento graduale | Conservazione in azoto liquido a –196° C

**Figura 9-20** ■ I tre passaggi principali per il congelamento di un embrione.

ne avviene molto tardivamente (12-14 giorni), i gemelli monozigoti possono rimanere connessi ed avere organi in comune (gemelli siamesi) (vedi anche Capitolo 20).

## *Congelamento di spermatozoi, ovociti ed embrioni*

La possibilità di congelare, conservare e poi recuperare gameti vitali è di estrema importanza in medicina della riproduzione. Già dai primi esperimenti di Christopher Polge sugli spermatozoi nel 1949 è apparsa evidente l'importanza del congelamento nella conservazione della fertilità dell'uomo. Per la donna questa possibilità si è aperta molto più tardi e per di più solo conservando embrioni. Infatti è del 1983 il primo successo che ha portato alla nascita di un bambino a partire da un embrione che era stato congelato allo stadio di 8 cellule. Oggi la metodica del congelamento di un embrione allo stadio di 4, 8 cellule o blastocisti viene eseguita comunemente nei laboratori di fecondazione assistita (Fig. 9-20). Le tecniche di congelamento sono due principalmente due, il congelamento lento, applicato da anni a partire dagli spermatozoi, e poi usata anche per embrioni e ovociti, e quella più avanzata, ma ancora in fase sperimentale della vitrificazione. La prima prevede che, una volta prelevati i gameti o prodotti gli embrioni, vengano immersi in soluzioni chimiche che impediscono la formazione di dannosi cristalli di ghiaccio nelle cellule (fungono cioè da "crioprotettore") e poi portati lentamente a temperature sempre più basse fino ad essere immersi in azoto liquido alla temperatura di –196°C. Lo scongelamento avviene invece in modo rapido per evitare che il campione permanga troppo a lungo a temperature critiche, che possono provocare la formazione di cristalli di ghiaccio. La vitrificazione è una tecnica sperimentale che permette di portare rapidamente a –196°C l'ovocito. In questo modo la cellula si "vitrifica", cioè solidifica rapidamente acquistando un aspetto vitreo, trasparente, eliminando il rischio della formazione dei cristalli di ghiaccio. Per arrivare a questo risultato però, il materiale biologico viene immerso in soluzioni ad elevata concentrazione di sostanze chimiche, sollevando dubbi sui possibili effetti tossici. La percentuale di gravidanza dopo lo scongelamento si aggira intorno al 25%. In Italia, la legge 40 del 1994, vietava il congelamento degli embrioni, ma una modifica successiva ora lo permette in caso di necessità per la paziente. Nel 1986 si è avuta la prima nascita di un bambino dopo fecondazione in vitro di ovociti umani che erano stati congelati e scongelati. Nel giro di qualche anno sono state descritte altre gravidanze, ma l'efficienza del metodo si è rivelata più bassa di quella ottenuta con gli embrioni, per cui il congelamento degli ovociti è ancora poco utilizzato nella pratica clinica. Il congelamento degli ovociti consente di superare i problemi legali, morali ed etici che si pongono con il congelamento degli embrioni. Infatti la possibilità di congelare i gameti femminili e la loro eventuale distruzione, nel caso si ritenga di non doverli più utilizzare, non comportano particolari problemi. Di contro, però, i risultati che si ottengono dopo lo scongelamento sono peggiori rispetto a quelli relativi allo scongelamento degli embrioni. L'ovocito infatti, per le sue caratteristiche di cellula grande e con alto contenuto di acqua, incontra maggiori problemi di sopravvivenza nei vari passaggi del congelamento e scongelamento. Inoltre gli ovociti, prelevati dopo stimolazione ovarica, sono nella metafase della seconda divisione meiotica. In questa fase i 23 cromosomi sono legati ai microtubuli del fuso mitotico e pertanto sono molto sensibili ai cambiamenti di temperatura. L'eventuale depolimerizzazione dei microtubuli dovuta alle basse temperature può portare ad un'alterata separazione dei cromosomi al momento della fecondazione e

quindi ad un aumento delle aneuploidie. Gli embrioni con aneuploidie difficilmente si impiantano e non sono in grado di progredire nello sviluppo.

## Bibliografia citata nel testo e letture consigliate


Chan AW e coll. Clonal propagation of primate offspring by embryo splitting. Science 287, 317-329, 2000.

Chung Y e coll. Reprogramming of human somatic cells using human and animal oocytes. Cloning and Stem Cells 11, 213-233, 2009.

Dietrich JE, Hiragi T. Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo. Development 134, 4219-4225, 2007.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 292, 154-156, 1981.

Fazleabas A, Kim JJ. What makes an embryo stick? Science 299, 355-356, 2003.

Flinter FA. Preimplantation genetic diagnosis. BMJ 322, 1008-1009, 2001.

Genbacev OD e coll. Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. Science 299, 405-408, 2003.

Graham CF. The design of the mouse blastocyst. Symposium of the Society of Experimental Biology 25, 371-379, 1971.

Gurdon JB. The Croonian Lecture, 1976: Egg cytoplasm and gene control in development. Proceedings Royal Society of London ser B 198, 211-247, 1977.

Lash GE, Legge M. Early pregnancy factor: an unresolved molecule. Journal of Assisted Reproduction and Genetics 14, 495-496, 1997.

Mandelbaum J. Embryo and oocyte cryopreservation. Human Reproduction 4, 43-47, 2000.

Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proceedings of National Academy of Science USA 78, 7634-7638, 1981.

Paria BC e coll. Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. Science 296, 2185-2188, 2002.

Spemann H. In: Embryonic development and induction. Yale University Press, New Haven CT, 1938.

Stitzel ML, Seydoux G. Regulation of the oocyte-to zygote transition. Science 316, 407-408, 2006.

Surani MA, Burton SC. Spatial distribution of blastomeres is dependent on cell division order and interactions in mouse morulae. Developmental Biology 1023, 335-341, 1984.

Surani MA e coll. Genetics and epigenetic regulators of pluripotency. Cell 128, 747-762, 2007.

Tachibana M e coll. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. Cell 153, 1-11, 2013.

Takahashi K e coll. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell, 131, 861-872, 2007.

Thomson JA e coll. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 282, 1145-1447, 1998.

Willadsen SM. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. Nature 25, 298-300, 1979.

Willadsen SM. The development capacity of blastomeres from 4- and 8-cell sheep embryos. Journal of Embryology and Experimental Morphology 65, 165-172, 1981.

Wilmut I e coll. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature 385, 810-813, 1997.

10

# Terza settimana di sviluppo

## Gastrulazione (transizione epitelio-mesenchimale primaria) e formazione dell'embrione trilaminare

Antonio Filippini

Durante la 3ª settimana di gravidanza, l'embrione umano va incontro ad uno dei processi più importanti dello sviluppo embrionale, la **gastrulazione** (processo noto anche come **transizione epitelio-mesenchimale primaria** nell'embriogenesi umana), durante la quale un embrione bilaminare a due foglietti (epiblasto e ipoblasto derivati dalla massa cellulare interna) verrà convertito in un embrione a tre foglietti germinativi con la formazione di **ectoderma**, **mesoderma** e **endoderma** (Fig. 10-1). Conseguentemente alla formazione dei tre foglietti avviene an-

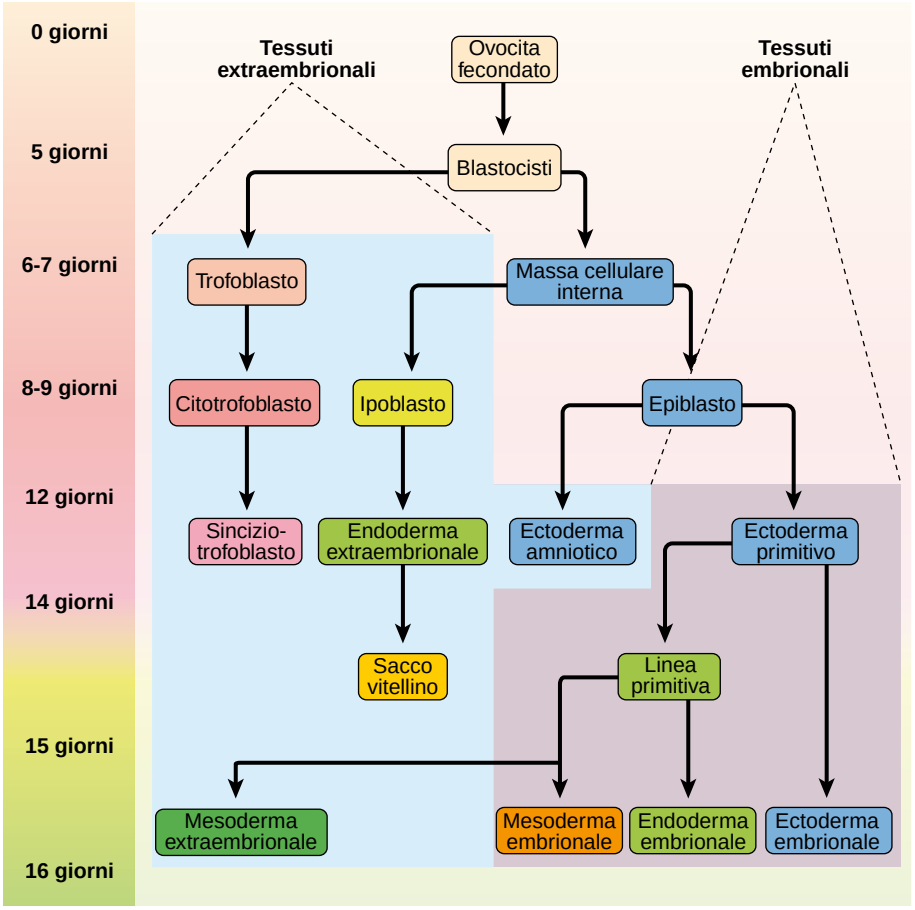



**Figura 10-1** Destino differenziativo cellulare e origine dei foglietti germinali embrionali e dei tessuti extraembrionali nell'embrione umano.

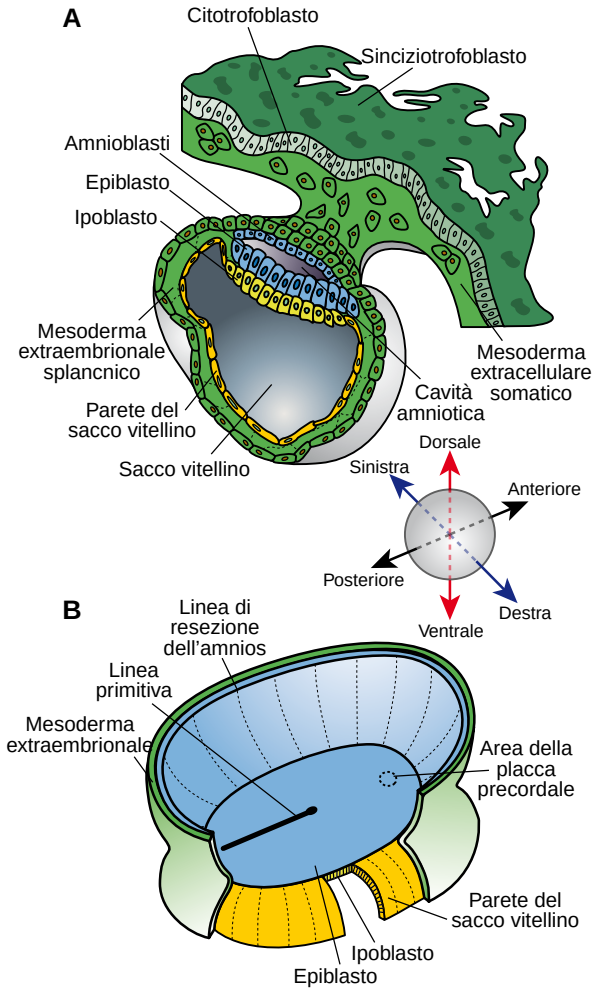



**Figura 10-2** ■ *A)* Disegno schematico che rappresenta i tessuti embrionali ed extraembrionali alla 2ª settimana di sviluppo. *B)* Disegno di un disco embrionale bilaminare all'inizio della 3ª settimana di sviluppo. La cavità amniotica si trova al di sopra della superficie dorsale dell'epiblasto. L'ipoblasto si trova in contatto e al di sotto del foglietto dell'epiblasto. La linea primitiva è costituita da un ispessimento del disco embrionale nella regione posteriore dell'epiblasto.

che la suddivisione dei foglietti nelle principali regioni organo-formative del corpo. Nell'uomo il processo di gastrulazione inizia tra il 14° e il 15° giorno di sviluppo. All'inizio della 3ª settimana l'embrione è un disco bilaminare di circa 0,2 mm di diametro; all'inizio della 4ª settimana il disco è divenuto trilaminare e si allunga fino ad arrivare ad un diametro maggiore di circa 2-3 mm.

Per facilitare la comprensione degli eventi morfogenetici che avvengono nel corso della 3ª settimana, lo sviluppo dell'embrione in questo periodo verrà suddiviso in differenti paragrafi. È necessario comunque tenere presente che tali eventi non sempre sono conseguenti l'uno all'altro, ma possono avvenire contemporaneamente.

Le cellule del foglietto germinativo ventrale, l'**ipoblasto** (la cui porzione craniale è nota come **endoderma viscerale anteriore** o **AVE**), producono alcune molecole segnale che porteranno alla formazione della **linea primitiva**, un ispessimento di cellule dell'**epiblasto** (il foglietto germinativo dorsale) che si forma in posizione caudale lungo la linea mediana del foglietto germinativo, che appare ora di forma ovoidale. La linea primitiva è la regione dove le cellule migranti dell'epiblasto, vanno incontro a un cambiamento di forma e poi si invaginano al di sotto dell'epiblasto attraverso il **solco primitivo**.

Da un'osservazione dorsale del disco embrionale, l'estremità più ampia rappresenta la regione rostrale (cefalica o anteriore); l'estremità più stretta forma la regione caudale o posteriore. La porzione del disco embrionale dove si trova la linea primitiva sarà destinata a divenire la parte posteriore del corpo. La comparsa della linea primitiva determina, quindi, l'**asse longitudinale dell'embrione** (rostro-caudale o antero-posteriore) nonché l'**asse dorso-ventrale** e la **simmetria bilaterale destro-sinistro** del corpo (Fig. 10-2).

## VIDEO 3 LA FORMAZIONE DELLA LINEA PRIMITIVA E DEI TRE FOGLIETTI GERMINATIVI

L'evento fondamentale della 3ª settimana di sviluppo è costituito dalla formazione della **linea primitiva**. Un ispessimento del disco embrionale, nella regione caudale dell'epiblasto, si inizia a formare sulla linea mediana lungo l'asse rostro-caudale. Questo ispessimento, chiamato linea primitiva, si forma in seguito alla proliferazione e alla migrazione delle cellule dell'epiblasto dalla periferia in direzione della linea mediana del disco embrionale e successivamente si allunga fino ad occupare approssimativamente la metà caudale del disco embrionale (Fig. 10-3A). Subito dopo la comparsa della linea primitiva, alla sua estremità cefalica (anteriore) si forma un rilievo di epiblasto, denominato **nodo primitivo** (anche noto come **nodo di Hensen**), che circonda una depressione chiamata **fossetta primitiva**. Analogamente e sempre in conseguenza dei movimenti cellulari di invaginazione si formerà un'incavatura lungo la linea primitiva denominata **solco primitivo**.

Dal 16°-17° giorno la linea primitiva costituisce la via di entrata delle cellule dell'epiblasto nello spazio sottostante tra epiblasto e ipoblasto. In funzione del loro punto di origine e del momento della loro migrazione, le cellule dell'epiblasto si allontanano dalla linea primitiva assumendo varie direzioni. Le cellule della prima ondata di invaginazione, che entrano attraverso la fossetta primitiva e il solco primitivo, vanno a rimpiazzare le cellule dell'ipoblasto e formeranno il foglietto dell'**endoderma embrionale definitivo** (Fig. 10-4A). Di particolare importanza è la regione più craniale dell'endoderma embrionale chiamata endoderma viscerale anteriore (AVE) per il suo ruolo nell'organizzare la regione craniale dell'embrione (vedi "Processi e molecole"). Nello stesso tempo si formano due nuove strutture, la **placca precordale** e il **processo notocordale**, in conseguenza

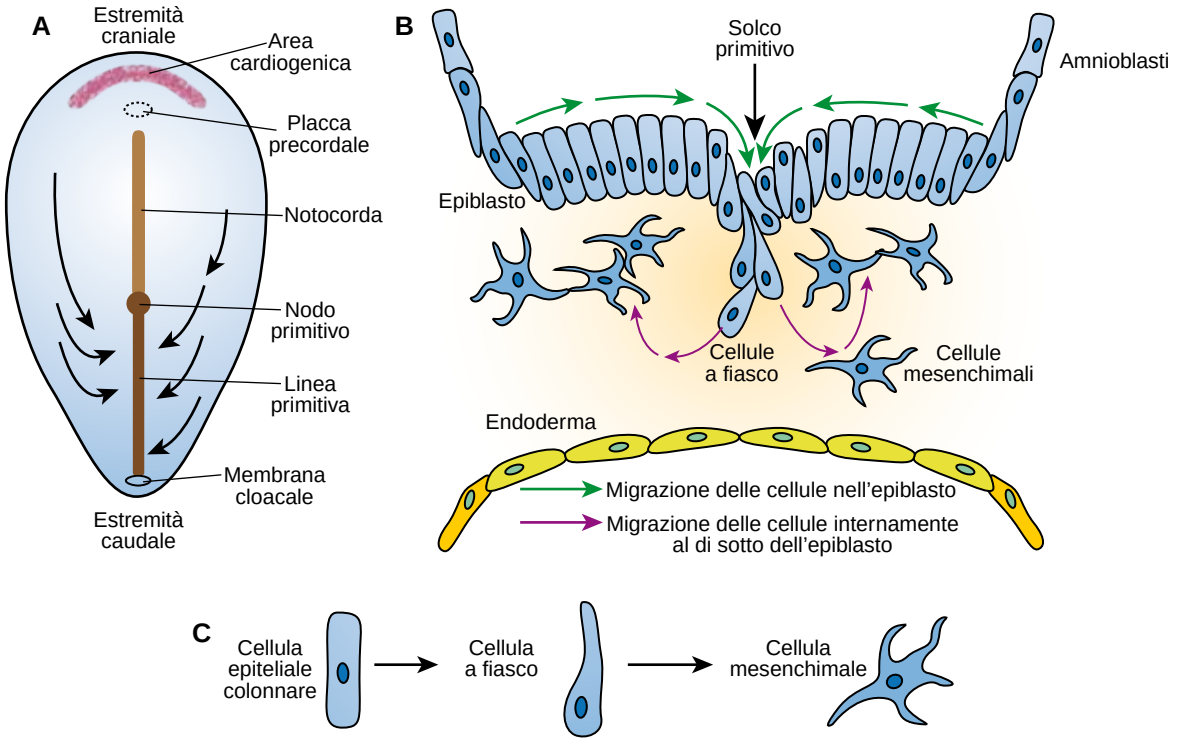



**Figura 10-3** ■ Gastrulazione. *A)* Le frecce indicano i movimenti migratori delle cellule dell'epiblasto in direzione della linea primitiva e del nodo primitivo. *B)* Migrazione, invaginazione e cambiamenti di forma delle cellule dell'epiblasto durante il processo di transizione epitelio-mesenchimale primaria (gastrulazione umana). *C)* Cambiamenti di forma delle cellule da una morfologia epiteliale ad una struttura di cellule a fiasco e quindi alla fine di cellule mesenchimali (cellule staminali pluripotenti con una morfologia stellata). Le cellule mesenchimali dopo il processo di invaginazione e di migrazione si riaggregano in strutture epiteliali quali endoderma e mesoderma.

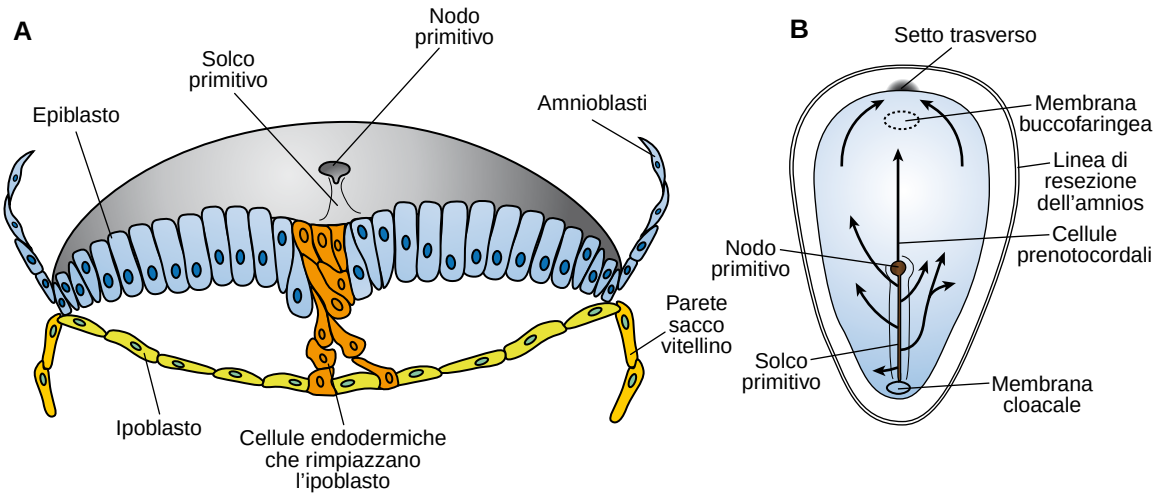



**Figura 10-4** ■ *A)* Le cellule dell'epiblasto, attraverso una prima ondata di invaginazione, rimpiazzano le cellule dell'ipoblasto con la formazione dell'endoderma embrionale definitivo. *B)* Ondate successive di invaginazione delle cellule dell'epiblasto attraverso il solco primitivo e la fossetta primitiva daranno origine al mesoderma. Le frecce indicano le varie direzioni di migrazione delle cellule del mesoderma. Notare che, in questo disegno di un embrione umano di circa 17 giorni, è presente la membrana cloacale oltre alla membrana buccofaringea.

dell'invaginazione e migrazione delle cellule attraverso il nodo primitivo in direzione craniale. La placca precordale è la componente endodermica (una piccola regione circolare di cellule endodermiche colonnari) della futura membrana bucco-faringea, che si trova verso l'estremità craniale del disco embrionale e rappresenta il limite di estensione craniale del processo notocordale (vedi paragrafo "Le membrane bilaminari"). Il processo notocordale è un cordone cellulare mesodermico che origina dal nodo primitivo (vedi paragrafo successivo "L'origine della notocorda").

Subito dopo la formazione dell'endoderma, un numero maggiore di cellule dell'epiblasto migrerà lungo la membrana basale dell'epiblasto e, in seguito a nuove ondate di invaginazione, darà origine a una lamina di cellule che si interpone tra l'endoderma definitivo e l'epiblasto. Questo strato intermedio costituisce il terzo foglietto germinativo, il **mesoderma embrionale**. Le cellule del mesoderma migreranno in tutte le direzioni: laterale, craniale e caudale (Fig. 10-4B). Eccezioni sono rappresentate dalla **membrana bucco-faringea** e dalla **membrana cloacale**, aree circolari caratterizzate dallo stretto contatto tra ectoderma ed endoderma senza interposizione di mesoderma che andranno a demarcare rispettivamente l'inizio e la fine del tubo intestinale primitivo.

Al polo anteriore dell'embrione (dove il mesoderma embrionale entra in contatto con il mesoderma extraembrionale) si forma un ispessimento di cellule mesenchimali che intorno al giorno 22 darà origine al **setto trasverso**. Durante il ripiegamento cranio-caudale della 4ª settimana, il setto trasverso assumerà una posizione caudale e ventrale rispetto al cuore in via di sviluppo e darà origine a una parte del diaframma toracico (tendine centrale del diaframma).

Al 19° giorno si viene a definire una regione fondamentale per il successivo sviluppo dell'embrione: la **regione cardiogenica**, la zona dove si differenzieranno gli abbozzi del cuore (tubi endocardici laterali). La regione cardiogenica è una regione che occupa un'area a ferro di cavallo che si trova tra l'estremità craniale del disco germinativo trilaminare e la membrana bucco-faringea (Fig. 10-3A) (vedi Capitolo 17).

Verso la metà della 3ª settimana (17°-18° giorno) dalla parete caudale (posteriore) del sacco vitellino si sviluppa il **diverticolo allantoideo** o **allantoide**. L'allantoide, una struttura vestigiale che svolge funzioni di organo respiratorio e raccolta di rifiuti liquidi negli embrioni aviari, si estende all'interno del peduncolo di connessione e si trasformerà nell'uraco, un cordone fibroso che formerà il legamento ombelicale mediano. Nella specie umana, l'allantoide rimane una struttura rudimentale ma potrebbe essere coinvolto nello sviluppo di malformazioni durante la formazione della vescica. Nell'embrione umano, l'allantoide è inoltre coinvolto nell'emopoiesi e i vasi allantoidei diventano le arterie e le vene ombelicali (vedi Capitolo 17).

Quando il mesoderma embrionale e l'endoderma definitivo sono formati, ciò che resta dell'epiblasto assume la denominazione di **ectoderma**. L'epiblasto è, quindi, il precursore di tutti e tre i foglietti definitivi del disco embrionale trilaminare: ectoderma, mesoderma ed endoderma.

Le cellule dell'epiblasto formano una lamina di epitelio nella quale le cellule sono legate da complessi giunzionali e, quindi, non in grado di migrare. Per la formazione della linea primitiva è necessario che le cellule dell'epiblasto vadano incontro a una cruciale transizione differenziativa (con rottura dei complessi giunzionali e ridotta espressione di molecole di adesione) che le renda in grado di migrare. Questo processo di invaginazione e migrazione delle cellule dell'epiblasto per la formazione del terzo foglietto embrionale è stato denominato, infatti, **transizione epitelio-mesenchimale (EMT) primaria** (gastrulazione nei vertebrati inferiori) (Fig. 10-3B,C). In

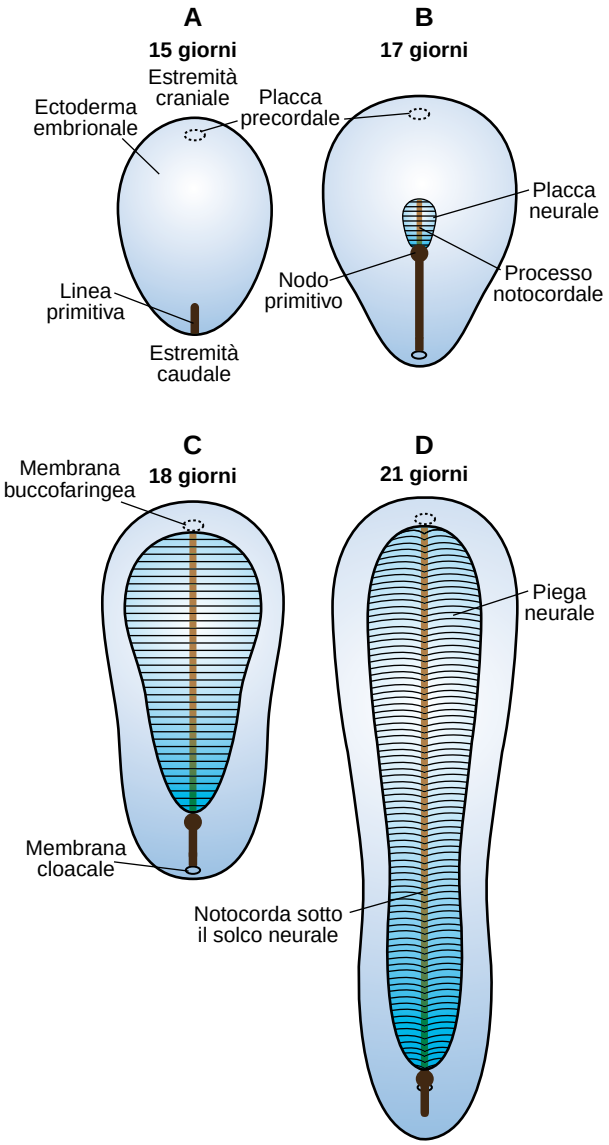



**Figura 10-5** ■ Disegni schematici che rappresentano lo sviluppo, durante la 3ª settimana, del disco embrionale visto dorsalmente. Notare il notevole sviluppo della placca neurale.

particolare, durante il processo di invaginazione le cellule dell'epiblasto vanno incontro, infatti, a cambiamenti di forma da cellule colonnari di tipo epiteliale diventano cellule a fiasco e quindi alla fine cellule mesenchimali (Fig. 10-3C). È stato dimostrato che tali cambiamenti morfologici coinvolgono la perdita di adesione cellula-cellula (cambiamenti di espressione delle caderine) nonché modificazioni citoscheletriche in modo tale che le cellule si possano muovere indipendentemente. Al termine del processo di transizione, le cellule mesenchimali si riorganizzano formando le lamine epiteliali dell'endoderma e del mesoderma (**transizione mesenchima-epiteliale** o **MET**).

Verso la fine della 3ª settimana di sviluppo il profilo del disco embrionale appare notevolmente modificato e l'embrione si è, infatti, notevolmente allungato lungo l'asse longitudinale cranio (rostro)-caudale (Fig. 10-5). Lo sviluppo maggiore riguarda comunque l'estremità cefalica in conseguenza della continua migrazione di cellule che, dalla linea primitiva, raggiungono questa regione. L'invaginazione delle cellule dell'epiblasto attraverso la linea primitiva e la loro successiva migrazione verso l'estremità anteriore e laterale continua, infatti, fino alla fine della 4ª settimana.

Intorno al 17° giorno la linea primitiva si estende per circa la metà del disco embrionale ma da questo momento va incontro ad una progressiva regressione in posizione sempre più caudale e alla 4ª settimana la sua lunghezza è il 15% di quella di tutto l'embrione. Verso la fine della 3ª settimana la linea primitiva è confinata a una regione denominata eminenza caudale. Alla fine della 4ª settimana la linea primitiva e il nodo scompaiono del tutto. Residui di questa struttura causano la formazione di teratomi sacro-coccigei (vedi paragrafo "Aspetti clinici e malformazioni").

## L'ORIGINE DELLA NOTOCORDA

Nel paragrafo precedente è stato visto che le cellule dell'epiblasto che si invaginano attraverso il nodo primitivo e migrano in direzione craniale formano il processo notocordale, un cordone di cellule del mesoderma che si spinge lungo la linea mediana tra ectoderma ed endoderma e raggiunge la placca precordale (Fig. 10-6). A questo livello il foglietto endodermico e quello ectodermico aderiscono così fortemente da bloccare l'ulteriore progressione del processo notocordale. In questo stesso tempo la linea primitiva retrocede e assume posizioni sempre più caudali. Nel corso del processo di migrazione cellulare il processo notocordale si trasforma in notocorda andando incontro ad una serie di modificazioni che avvengono in tre fasi successive: la **fase di canale cordale**, di **placca cordale** e **notocorda**:

- nella prima fase, in un embrione di circa 17 giorni, il processo notocordale presenta una cavitazione centrale e forma un piccolo tubicino cavo, il canale cordale (Fig. 10-6A);
- intorno al 18° giorno, nella seconda fase, il canale cordale aderisce con la sua faccia ventrale al foglietto endodermico sottostante e successivamente le cellule corrispondenti alla linea di adesione si riassorbono producendo delle lacerazioni. Il canale cordale si trasforma così in una doccia aperta mettendo in comunicazione la cavità amniotica con quella del sacco vitellino secondario. In questo stadio il canale cordale prende il nome di canale neurenterico. Il processo notocordale forma quindi una placca cellulare denominata placca cordale (Fig. 10-6B);
- in seguito, intorno al 19° giorno, tale placca si ispessisce, si solleva verso l'alto ripiegandosi su se stessa, perde il contatto con il foglietto endodermico e le due metà, quindi, si ricompongono in uno strato continuo. Si forma così un cordone cilindrico di cellule che si interpone tra ectoderma ed endoderma e prende il nome di notocorda (Fig. 10-6C).

Tutte queste trasformazioni che portano alla formazione della notocorda non avvengono simultaneamente lungo l'asse dell'embrione ma iniziano nel tratto del disco embrionale che corrisponde ai primi due somiti e in seguito si estendono nei due sensi, cefalico e caudale. La notocorda compare durante l'embriogenesi in tutti i vertebrati e rappresenta l'asse intorno al quale si organizzeranno i corpi vertebrali e i dischi intervertebrali. Nei vertebrati superiori la notocorda, comunque, si riassorbe quasi completamente (residui della notocorda formeranno il nucleo polposo dei dischi intervertebrali) durante il processo di organizzazione della colonna vertebrale. Le Figure 10-6D,E mostrano le caratteristiche morfologiche della notocorda umana.

Bisogna sottolineare che nel corso della gastrulazione il disco embrionale si allunga in senso longitudinale andando, quindi, ad aumentare la distanza tra placca precordale e nodo primitivo. Alla fine della 3ª settimana, la notocorda si estende dalla membrana bucco-faringea fino al nodo primitivo e la sua lunghezza continua ad accrescersi anche durante la 4ª settimana sia in conseguenza della crescita embrionale sia perché il nodo primitivo assume posizioni sempre più caudali. Quando il nodo primitivo raggiunge la membrana cloacale verso la fine della 4ª settimana, la linea primitiva e la fossetta primitiva scompaiono.

La **notocorda**, quindi, 1) costituisce l'asse rigido intorno al quale si svilupperà l'embrione; 2) determina l'asse longitudinale dell'embrione e permette l'allungamento dell'asse corporeo; 3) è coinvolta nella costituzione del mesoderma parassiale e definisce l'asse attorno al quale si organizzano i corpi vertebrali; 4) induce il differenziamento delle cellule dell'ectoderma in neuroectoderma (placca neurale) (vedi paragrafo successivo sulla Formazione del sistema nervoso e Capitolo 13) e, più recentemente, alcuni studi indicano che potrebbe essere la sorgente di segnali coinvolti nello sviluppo di tessuti dell'endoderma.

## LE MEMBRANE BILAMINARI

Come abbiamo già visto, alla fine della 3ª settimana nel disco embrionale lungo la linea mediana troviamo due aree circolari caratterizzate dallo stretto contatto tra ectoderma ed endoderma, senza interposizione di meso-

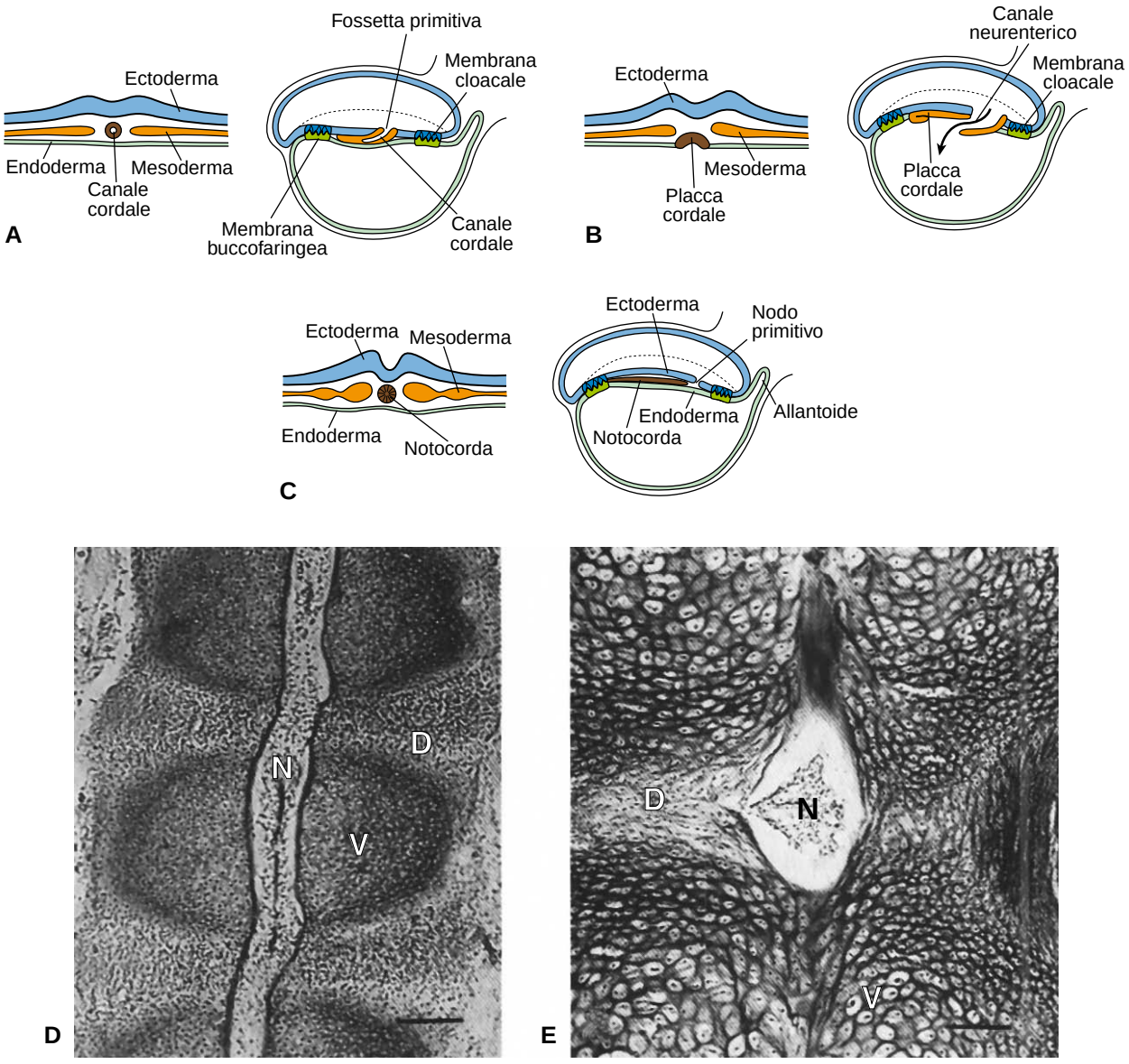



**Figura 10-6** ■ Processo di trasformazione del processo notocordale in notocorda. *A)* fase di canale cordale; *B)* fase di placca cordale; *C)* fase di formazione della notocorda; *D)* sezione sagittale, attraverso la colonna vertebrale di un embrione umano di 5 settimane – notare la notocorda (N) che si estende come un cordone solido di cellule attraversando i futuri corpi vertebrali (V) e i dischi intervertebrali (D); *E)* sezione sagittale attraverso la colonna vertebrale di un feto umano di 12 settimane dove si può vedere la notocorda nel processo di formazione del nucleo polposo dei dischi intervertebrali e la sua progressiva degenerazione all'interno dei corpi vertebrali. (*Da* M.S. Babić, Development of the notochord in normal and malformed human embryos and fetuses, Int. J. Dev. Biol. 35: 345-352, 1991, per gentile concessione).

derma, che formano due membrane bilaminari: la membrana bucco-faringea (in posizione craniale, nella regione della placca precordale) e la membrana cloacale (caudale alla linea primitiva). Le **membrane bucco-faringea** e **cloacale** costituiranno successivamente le estremità a fondo cieco dell'intestino primitivo. Nel corso del successivo sviluppo entrambe queste membrane saranno riassorbite: la membrana bucco-faringea si perfora alla 4ª settimana per formare l'apertura della cavità orale, mentre la membrana cloacale si lacererà durante la 7ª settimana formando l'apertura anale e quella del tratto urogenitale (vedi Capitoli 15 e 16).

## SVILUPPO E SUDDIVISIONE DEL MESODERMA

Come è stato precedentemente descritto, le cellule dell'epiblasto che migrano e si invaginano a livello del nodo primitivo formeranno la notocorda, mentre le cellule dell'epiblasto che invaginano attraverso la linea primiti-

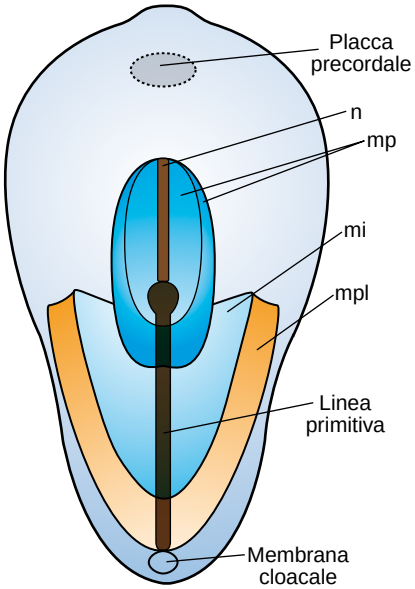



**FIGURA 10-7** ■ Veduta dorsale dell'embrione e destino delle cellule migratorie dell'epiblasto. Le cellule di specifiche aree dell'epiblasto migrano e si invaginano attraverso il nodo primitivo e tratti specifici del solco primitivo per formare il mesoderma. Le cellule che si invaginano attraverso l'estremità anteriore del nodo formeranno la notocorda (n); le cellule che si invaginano verso l'estremità più caudale del nodo primitivo e verso la porzione più anteriore della linea primitiva formeranno il mesoderma parassiale (mp); le cellule che si invaginano attraverso la regione intermedia della linea primitiva formeranno il mesoderma intermedio (mi) e quelle che migrano attraverso la porzione più caudale daranno origine al mesoderma laterale (mpl); le cellule che si invaginano verso l'estremità più posteriore della linea primitiva daranno un contributo alla formazione del mesoderma extraembrionale.

va migreranno in tutte le direzioni e formeranno due lamine di mesoderma separate dalla notocorda. Il destino delle cellule migratorie dell'epiblasto è determinato dallo specifico tratto della linea primitiva attraverso cui le cellule si invaginano (Fig. 10-7).

Verso il 18° giorno di sviluppo, ad iniziare dalla regione cefalica dell'embrione, il mesoderma che sta immediatamente ai lati della notocorda, vicino all'asse centrale, prolifera attivamente e forma due spessi cordoni paralleli di tessuto che prendono il nome di **mesoderma parassiale** (Fig. 10-8). Tale processo coincide con la formazione, sulla superficie dell'ectoderma, della doccia neurale (vedi paragrafo "Induzione della placca neurale e neurulazione"). Lateralmente al mesoderma parassiale il foglietto mesodermico mantiene il suo aspetto di lamina appiattita e costituirà il mesoderma laterale. Subito dopo la sua formazione, fra le cellule del mesoderma laterale erano comparse numerose piccole cavità che verso il 19° giorno confluiranno tra di loro formando un'ampia fessura che divide il **mesoderma laterale** in due lamine dorsale e ventrale:

- la lamina dorsale formerà il **mesoderma somatico** o somatopleura parietale, che è a contatto con l'ectoderma e si continua sui lati con il mesoderma somatopleurico extraembrionale stratificato esternamente all'amnios;

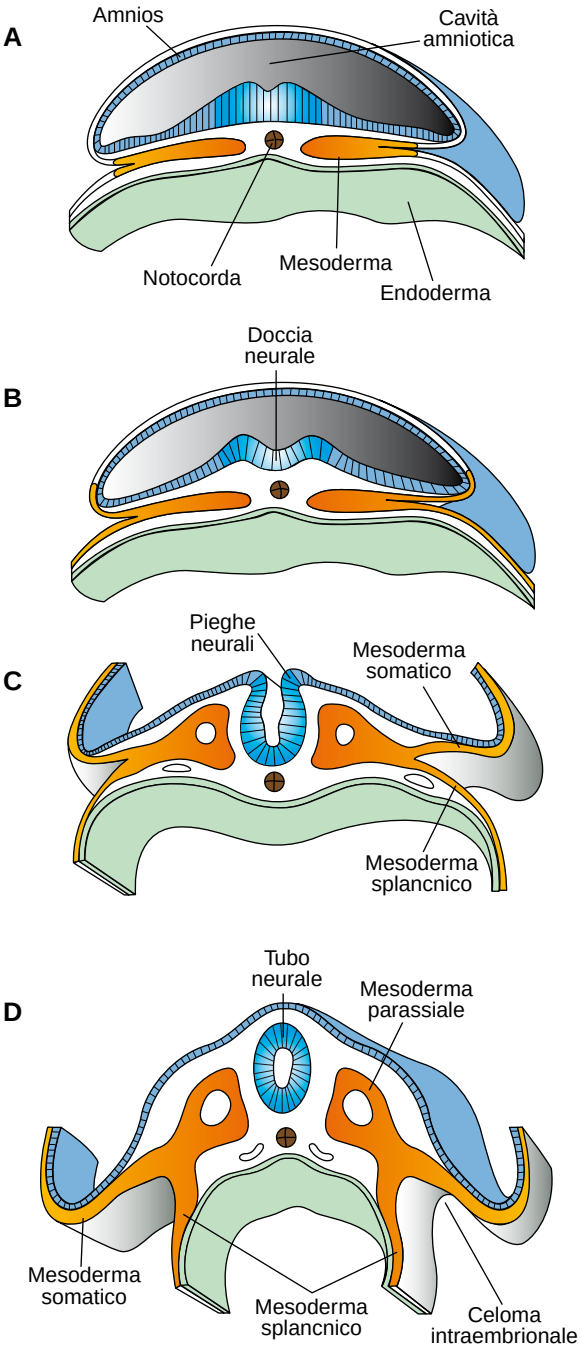



**FIGURA 10-8** ■ Processo di sviluppo e suddivisione del mesoderma. *A)* Formazione delle due lamine di mesoderma ai lati della notocorda; *B)* le regioni di mesoderma vicino all'asse embrionale si ispessiscono (mesoderma parassiale); *C)* formazione di un'ampia fessura (celoma intraembrionale) ai lati del disco embrionale che divide il mesoderma laterale in mesoderma somatico e mesoderma splancnico; *D)* alla fine della 3ª settimana si formeranno cinque differenti parti di mesoderma (notocorda, parassiale, intermedio, somatico e splancnico).

- la lamina ventrale formerà il **mesoderma splancnico** o splancnopleura viscerale, che aderisce all'endoderma e si continua sui lati con il mesoderma splancnopleurico extraembrionale che riveste esternamente il sacco vitellino. La cavità che si viene a formare conseguentemente alla separazione delle due lamine di mesoderma laterale prende il nome di **celoma embrionale**. In questa fase dello sviluppo tale cavità comunica ampiamente, sui lati dell'embrione, con il celoma extraembrionale.

Il tessuto mesodermico che connette il mesoderma parassiale con il mesoderma laterale assumerà la forma di due cordoni di tessuto paralleli, uno a destra e l'altro a sinistra, e costituirà il **mesoderma intermedio**. Questi cordoni longitudinali di tessuto mesodermico costituiranno i cordoni urogenitali in quanto sono destinati a formare i vari apparati escretori che si succedono durante la vita embrionale e fetale, e contribuiranno allo sviluppo delle gonadi.

Verso la fine della 3ª settimana, inoltre, il mesoderma parassiale inizierà un processo di segmentazione, in direzione cranio-caudale, che porterà alla formazione di raggruppamenti cellulari denominati **somitomeri** (processo di metamerizzazione). Inizialmente, i somitomeri sono organizzati come un epitelio pseudostratificato che delimita una cavità centrale, il **somitocele** o **miocele**. Dopo pochi giorni la loro formazione i somitomeri, ad eccezione dei primi sette, andranno incontro a un processo di frammentazione che porterà alla formazione di blocchi distinti di mesoderma segmentale a intervalli regolari, i **somiti** (vedi Capitolo 11). Come vedremo, oltre al mesoderma parassiale che produce 42-44 coppie di somiti, anche la porzione più cefalica del mesoderma intermedio che formerà i nefrotomi va incontro a un processo di segmentazione. Il mesoderma non segmentato sarà rappresentato dalle due lamine somatica e splancnica del mesoderma laterale e dalla regione caudale del mesoderma intermedio (metanefro) che formerà il rene definitivo.

Appare fondamentale sottolineare che le differenti parti di mesoderma che si sono formate in questo periodo non differiscono solo per la loro struttura o localizzazione spaziale, ma soprattutto perché ogni tipo di mesoderma formerà, nel corso del successivo sviluppo, differenti organi e apparati. Occorre qui aggiungere che numerose osservazioni in embrioni di diverse specie incluso l'umana, hanno identificato una quinta regione mesodermica costituita da una piccola massa di cellule mesenchimali localizzate anteriormente alla notocorda chiamata **placca precordale mesodermica**. Queste cellule deriverebbero da cellule del nodo primitivo di Hensen che migrano nelle prime fasi della gastrulazione andando inizialmente a formare la placca precordale endodermica. Altre osservazioni suggeriscono che le cellule della placca precordale mesodermica si formerebbero direttamente dal nodo di Hensen subito prima della migrazione delle cellule destinate a formare la notocorda. In ogni caso, la placca precordale mesodermica ha un importante ruolo induttivo per la formazione di regioni craniali del cervello e dà origine al mesenchima che contribuisce alla formazione di muscoli e ossa della testa. Le cellule che rimangono a formare la placca precordale endodermica contribuiscono alla formazione della membrana bucco-faringea. Infine vanno ricordate altre due strutture mesodermiche. Si tratta del **mesoderma trasverso**, una massa di cellule di origine incerta che si posiziona davanti alla membrana bucco-faringea e che darà origine ad una parte del setto trasverso e l'**eminenza caudale**, un gruppo di cellule che migrano dal nodo in regressione e che danno origine alla parte caudale del midollo spinale (neurulazione secondaria) e dell'intestino primitivo nonché ad alcuni somiti e vertebre sacrali.

## SVILUPPO INIZIALE DELL'APPARATO CARDIOVASCOLARE PRIMITIVO

La **vasculogenesi** rappresenta, durante lo sviluppo embrionale, il processo di formazione dei vasi sanguigni e si manifesta all'inizio della terza settimana nel mesoderma extraembrionale, del sacco vitellino secondario, dell'allantoide, nel peduncolo di connessione e del corion. I vasi sanguigni dell'embrione si inizieranno a sviluppare circa due giorni più tardi. Lo sviluppo precoce dell'apparato cardiovascolare è in relazione con la mancanza di una significativa quantità di nutrienti di riserva nel sacco vitellino e quindi, alla conseguente necessità impellente di vasi sanguigni in grado di trasportare ossigeno e nutrienti dalla circolazione materna all'embrione (attraverso la placenta che inizia il suo sviluppo con la formazione dei villi coriali primari). Fino al termine della seconda settimana di sviluppo il nutrimento dell'embrione viene assicurato dalla diffusione, attraverso il celoma extraembrionale e il sacco vitellino, delle sostanze nutrienti e dell'ossigeno provenienti dal sangue materno. Durante la terza settimana di sviluppo si forma una primitiva circolazione utero-placentare. Il **cuore** e i grandi vasi si sviluppano dal mesoderma splancnico nella **regione cardiogenica**. Nel corso della terza settimana il cuore si abbozza sottoforma di due **tubi endocardici** destro e sinistro che si fonderanno tra loro subito all'inizio della quarta settimana formando il cuore tubulare primitivo. Le prime contrazioni del cuore si osservano già al 22°-23° giorno (vedi Capitolo 17).

## IL CELOMA INTRAEMBRIONALE

Il **celoma intraembrionale** o **embrionale** appare all'inizio nella placca di mesoderma laterale in forma di diverse piccole cavità. Queste piccole cavità confluiscono insieme e durante il ripiegamento laterale dell'embrione alla 4ª settimana formano un canale a forma di U che circonda l'estremità cefalica del disco embrionale ed i lati di questa fino alla linea primitiva (Fig. 10-8). Inizialmente è presente una connessione tra i celomi intraembrionale ed extraembrionale ma con il progressivo ripiegamento dell'embrione i due margini dell'ectoderma si fondono lungo la linea mediana con il risultato che il celoma intraembrionale (incluso nel mesoderma laterale) si separa da quello extraembrionale. È da questa cavità

unitaria del celoma intraembrionale che derivano successivamente le distinte cavità sierose del corpo, in seguito all'organizzazione completa del diaframma e alla comparsa delle pieghe pleuro-pericardiche: la cavità peritoneale e vaginale del testicolo, la cavità pericardica e le cavità pleuriche (vedi anche Capitolo 11).

## INDUZIONE DELLA PLACCA NEURALE E NEURULAZIONE: LA FORMAZIONE DEL SISTEMA NERVOSO

La prima evidenza nella formazione del sistema nervoso è la comparsa, al 17°-18° giorno di sviluppo, di una regione ispessita di ectoderma lungo l'asse mediano, posta cranialmente al nodo primitivo e denominata placca neurale (Fig. 10-9A). La placca neurale rappresenta, quindi, il primordio del sistema nervoso centrale ed origina in seguito ad un'azione induttiva della notocorda sulle sovrastanti cellule dell'ectoderma. La **placca neurale**, costituita da cellule divenute alte e colonnari a differenza delle cellule dell'ectoderma circostante, appare a forma di scudo con la sua estremità craniale più ampia (che darà origine all'encefalo) e l'estremità caudale più stretta (che darà origine al midollo spinale). Approssimativamente circa il 50% dell'ectoderma diviene placca neurale e la parte rimanente darà origine all'epidermide. È importante sottolineare che esiste uno stretto parallelismo tra lo sviluppo del mesoderma della notocorda e lo sviluppo della placca neurale, e ciò è dovuto al fatto che l'ectoderma viene indotto a differenziarsi in **neuroectoderma** (tessuto nervoso) dal sottostante mesoderma della notocorda. Il processo di induzione è molto complesso e trova la sua origine nella secrezione di differenti fattori (vedi "Processi e molecole"), da parte delle cellule di mesoderma, che diffondono in direzione dell'ectoderma sovrastante attivando, in queste cellule, geni responsabili del differenziamento delle cellule in senso neurale.

Verso la fine della 3ª settimana, i margini laterali della placca neurale si sollevano e vanno a formare le **pieghe neurali**, mentre la regione mediana infossata forma la doccia neurale (Fig. 10-9B). Gradualmente, le pieghe neurali convergono medialmente e si saldano dando origine al **tubo neurale** e alle cellule della **cresta neurale** (la parte laterale delle pieghe neurali che non viene incorporata nel tubo neurale) (Fig. 10-9C) (vedi anche Capitolo 2). Le cellule della cresta neurale sono caratterizzate da un'elevata abilità migratoria e da una notevole eterogeneità fenotipica in quanto daranno successivamente origine a numerosi e differenti tipi di cellule differenziate. Per questi motivi, la cresta neurale viene anche considerata come un 4° foglietto germinativo. Quando le cellule della cresta neurale si separano dal tubo neurale vanno incontro a un processo di transizione epitelio-mesenchimale che le permetterà di migrare all'interno del sottostante mesoderma. È necessario sottolineare che il termine mesoderma si riferisce al tessuto compatto che ha origine dall'epiblasto (transizione epitelio-mesenchimale primaria), mentre con il termine **mesenchima** si indica un tessuto lasso connettivale

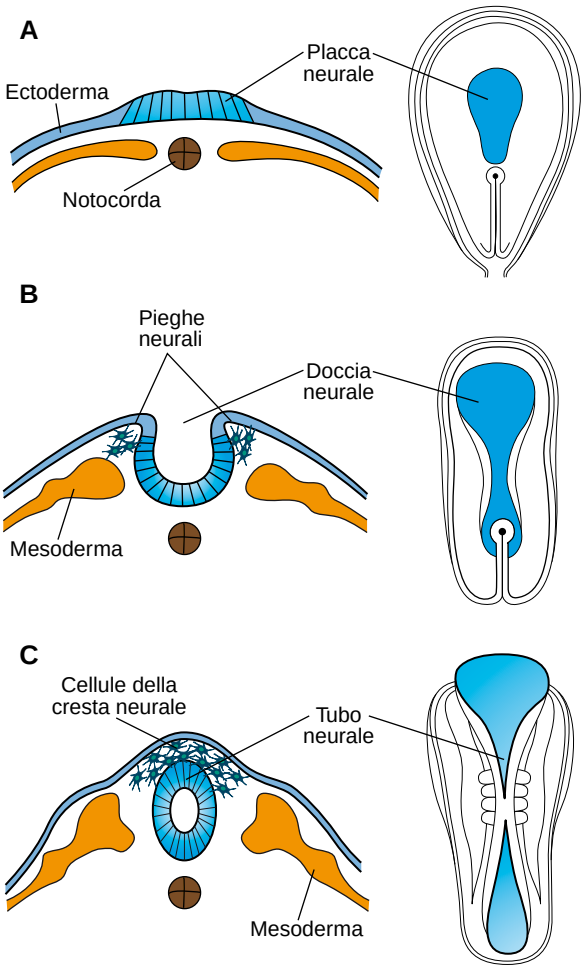



**Figura 10-9** ■ Disegni che illustrano la formazione del sistema nervoso dal neuroectoderma. *A)* Al 17°-18° giorno di sviluppo si forma la placca neurale; *B)* al 19° giorno si formano le pieghe neurali; *C)* al 21° giorno di sviluppo le pieghe neurali si saldano e danno origine al tubo neurale e alle cellule della cresta neurale.

dell'embrione, indipendentemente dal tessuto di origine.

Da un punto di vista morfogenetico e di regolazione molecolare (vedi paragrafo "Processi e molecole") il processo di neurulazione non è identico lungo tutto l'asse longitudinale dell'embrione ma si diversifica in un processo di **neurulazione primaria** (che darà origine alla parte anteriore del tubo neurale con una sequenza di eventi che è già stata descritta) e **neurulazione secondaria** che nel topo, e probabilmente anche nell'uomo, inizierà dal livello della 35ª coppia di somiti dando origine alla porzione posteriore del tubo neurale. La neurulazione secondaria consiste nella formazione del tubo neurale da un cordone solido di cellule (eminenza caudale) che viene indotto ad invaginarsi dal nodo di Hensen in regressione e in seguito diventa cavo, formando il tubo neurale. La conoscenza dei meccanismi che regolano la neurulazione secondaria potrebbero essere di notevole importanza in medicina, considerando l'alto numero di

malformazioni del tratto più caudale del midollo spinale nell'uomo. Oltretutto, anche il ripiegamento del tubo neurale non avviene contemporaneamente lungo tutto l'asse embrionale. Infatti, la chiusura del tubo neurale inizia intorno al 20° giorno nella regione cervicale, approssimativamente a livello della quarta coppia di somiti, e procede velocemente in direzione cefalica e caudale. Raggiunta l'estremità craniale e caudale dell'embrione il processo di chiusura si arresta e, per qualche giorno, rimangono alle estremità del tubo neurale due aperture denominate **neuroporo anteriore** (craniale) e **neuroporo posteriore** (caudale) che comunicano con la cavità amniotica.

La chiusura del neuroporo anteriore avviene approssimativamente al 23°-25° giorno e del neuroporo posteriore al 25°-28° giorno. Difetti nella chiusura del neuroporo anteriore o posteriore causano rispettivamente, anencefalia e spina bifida (vedi Capitolo 13).

La chiusura del tubo neurale richiede una rete complessa di azioni reciproche tra fattori genetici e ambientali. Alcuni geni sono stati identificati e sembrano essenziali nella formazione del tubo neurale nei mammiferi anche se, comunque, fattori presenti nella dieta come il colesterolo e l'acido folico presentano un ruolo certamente critico. A questo proposito, negli USA è suggerita un'assunzione supplementare giornaliera di 0,4 mg di **acido folico** (vitamina B9), a tutte le donne in gravidanza, per ridurre il rischio di avere bambini con difetti del tubo neurale.

## GLI ANNESSI EMBRIONALI DURANTE LA 3ª SETTIMANA

L'embrione in via di sviluppo all'interno dell'utero è dotato di alcune strutture, gli **annessi embrionali**, che lo proteggono e lo nutrono, gli consentono di respirare e di eliminare le sostanze di rifiuto.

Il **corion** è la membrana più esterna costituita da sinciziotrofoblasto, citotrofoblasto e mesoderma extraembrionale somatico, delimita la cavità corionica ed è organizzata formando dei ripiegamenti, denominati **villi coriali**, mediante i quali l'embrione si fissa alla mucosa dell'utero; il corion quindi si forma precocemente e produce già un ormone, la gonadotropina corionica (hCG), che stimola il corpo luteo a produrre progesterone (il quale, a sua volta, favorisce l'impianto dell'embrione e il procedere della gravidanza).

L'**amnios** è una membrana che delimita lo spazio della cavità amniotica in cui si muoverà il feto; si tratta di un sacco che avvolge l'embrione e contiene **liquido amniotico**, la cui funzione è quella di attutire gli urti e impedire la disidratazione dell'embrione. Si rompe spontaneamente al momento del parto: la rottura dell'amnios e la fuoriuscita del liquido, le cosiddette "acque", indicano che il parto è imminente.

L'**allantoide** costituisce un annesso embrionale nei vertebrati Amnioti, esteso e vascolarizzato, che funge da organo respiratorio e nella cui cavità (vescicola allantoidea) si raccolgono i prodotti di escrezione dell'embrione (nell'uomo questo annesso embrionale perde però la funzione di deposito dei cristalli di acido urico). I vasi allantoidei diventano i vasi ombelicali e mettono in comunicazione la circolazione embrionale con la circolazione del corion. I vasi allantoidei, di cui l'allantoide ha indotto la formazione, si sviluppano sempre di più e alla fine diventeranno due arterie e una vena del cordone ombelicale, cioè i vasi sanguigni del cordone ombelicale.

Il **sacco vitellino** presente durante la terza settimana non svolge funzione di deposito di materiali nutritivi ma svolge altre funzioni:

- nella sua parete transitano le **cellule germinali primordiali**;
- nello spessore della sua parete di mesoderma extraembrionale si formano le **isole sanguigne di angioblasti** (funzione angiogenetica ed emopoietica del sacco vitellino).

## L'EMBRIONE ALLA FINE DELLA 3ª SETTIMANA

Alla fine della 3ª settimana l'embrione ha la forma di un disco piuttosto allungato di circa 2-3 mm di lunghezza sospeso per mezzo del peduncolo di connessione all'interno della sfera corionica di circa 12-15 mm di diametro. Rimuovendo il corion, l'embrione presenta dorsalmente l'amnios e ventralmente il sacco vitellino. Rimosso anche l'amnios, è ben visibile la prominenza sulla superficie dorsale dell'ectoderma del tubo neurale in formazione già chiuso nella regione mediana dove è ricoperto dal rivestimento trasparente dell'epi-ectoderma (futura epidermide) e aperto anteriormente e posteriormente rispettivamente nel neuroporo anteriore e posteriore. Ai lati del tubo neurale sono visibili sul dorso i rigonfiamenti dei **somitomeri** che nella regione occipi-

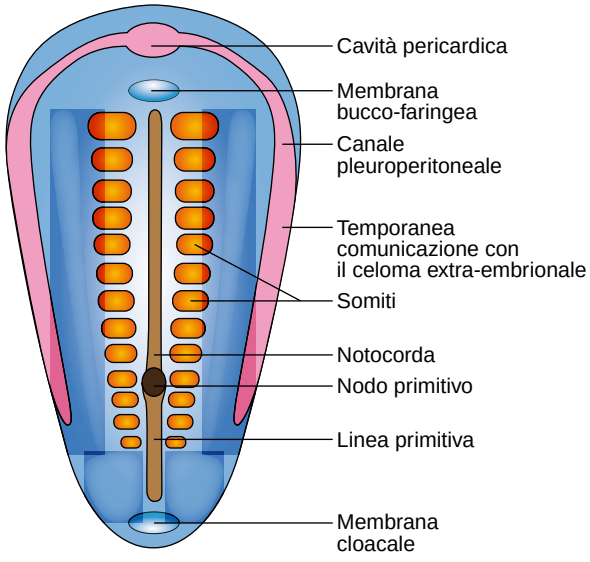



**Figura 10-10** ■ Veduta dorsale dell'embrione alla fine della terza settimana dove è evidente, insieme alle altre strutture, il celoma intraembrionale (in rosa) rappresentato da un canale ripiegato ad U nella regione craniale.

tale stanno iniziando a frammentarsi nelle prime paia di **somiti**. All'interno, il mesoderma laterale ancora unito al mesoderma intermedio, ha formato un primitivo **celoma intraembrionale** che ha la forma di un canale ripiegato ad U nella regione craniale (Fig. 10-10), ed è ancora ampiamente comunicante con il celoma extraembrionale. Nell'area cardiogenica sita a livello della concavità della U del celoma e davanti alla membrana buccofaringea, cellule provenienti dalla splancnopleura hanno formato i due tubi endocardici e i primi vasi sanguigni ad essi collegati (vedi Capitolo 17). L'**area cardiogenica** è identificabile dall'esterno come un rigonfiamento ventrale nella regione anteriore dell'ectoderma. L'endoderma è ancora formato da una lamina discoidale piatta allungata i cui margini ventralmente si continuano con il sacco vitellino; posteriormente mostra una piccola estroflessione, l'**allantoide**, immersa nel mesoderma del peduncolo di connessione.

## PROCESSI E MOLECOLE

### *Determinazione degli assi corporei: ruolo dell'AVE, della linea primitiva e del nodo primitivo (di Hensen)*

La costituzione degli assi corporei è un evento cruciale e molto complesso dell'iniziale sviluppo embrionale degli organismi superiori. I vertebrati presentano tre **assi corporei**: **antero-posteriore**, **dorso-ventrale** e **destro-sinistro**. Lo studio dei meccanismi e dei fattori segnale coinvolti nella costituzione degli assi corporei si è avvalso soprattutto di modelli sperimentali animali. È importante sottolineare, comunque, che i geni che regolano l'organizzazione spaziale durante lo sviluppo embrionale sono ben conservati nel corso dell'evoluzione tra i vertebrati e gli invertebrati. Cercheremo qui di seguito di riassumere quelle che sono attualmente le ipotesi più accreditate sui meccanismi che controllano questi complessi processi.

Spemann e Mangold (1924), con studi di embriologia sperimentale classica su anfibi, hanno per primi descritto l'esistenza di una struttura embrionale, l'**organizzatore embrionale primario,** chiamato in seguito **organizzatore di Spemann-Mangold**, in grado, quando trapiantato ectopicamente di indurre la formazione di un secondo corpo completo di sistema nervoso e quindi capace di controllare l'intero piano di sviluppo del corpo dell'embrione (Fig. 10-11) (vedi anche Capitolo 1). L'esistenza dell'organizzatore primario è stata confermata in tutti i vertebrati studiati e corrisponde in sequenza temporale alla **linea primitiva** e al **nodo primitivo** o **nodo di Hensen** (equivalente funzionale dell'organizzatore di Spemann-Mangold).

#### *Determinazione dell'asse antero-posteriore*

Il primo segno morfologicamente riconoscibile della formazione di un asse antero-posteriore (A-P) è la comparsa della linea primitiva nel margine posteriore del disco epiblastico. Come descritto nei paragrafi precedenti il nodo di Hensen costituisce l'estremità anteriore della linea primitiva. Recentemente è stato dimostrato in diversi modelli animali, e in particolare nel topo, che poco prima della formazione di queste strutture, nell'ipoblasto si sviluppa un altro centro organizzatore fondamentale per la determinazione dell'asse A-P, l'**endoderma viscerale anteriore (AVE)**. I meccanismi che portano allo sviluppo dell'AVE nella regione anteriore dell'ipoblasto non sono stati ancora completamente chiariti, ma sembra probabile che essi si attivino prima o in concomitanza dell'impianto. Difatti, nel topo, cellule che esprimono tipici marcatori delle cellule dell'AVE quali le proteine **CER-I** (cerberus 1 homolog) e **Lefty 1** sono già presenti nell'ICM della blastocisti. Le cellule dell'AVE, una volta raggiunta

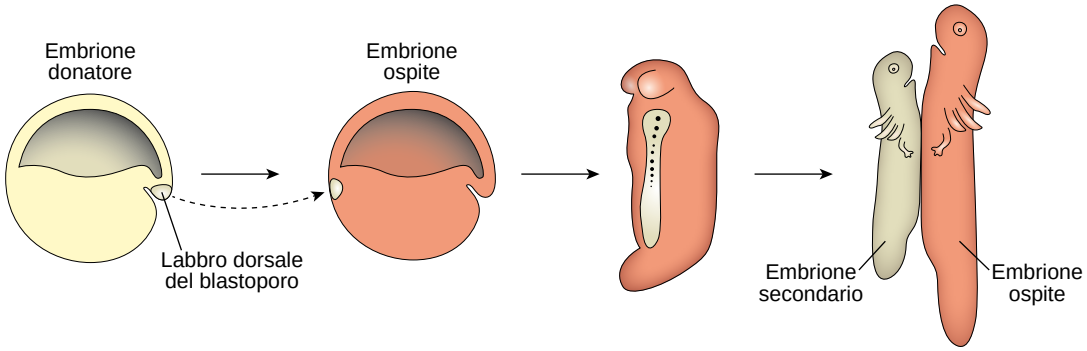



**Figura 10-11** ■ Scoperta dell'"organizzatore". Spemann e Mangold dimostrarono che di tutti i tessuti della gastrula (anfibi) a stadi iniziali, solo il labbro dorsale del blastoporo ha un destino predeterminato ed è dotato di capacità di autodifferenziamento. Infatti, se tale regione venisse trapiantata nell'ectoderma ventrale di un'altra gastrula, manterrebbe le proprie caratteristiche di labbro del blastoporo e, in aggiunta, è in grado di dare avvio agli eventi della gastrulazione nei tessuti adiacenti, fino alla formazione di un secondo embrione completo, unito ventralmente all'embrione ospite. Per questo motivo Spemann chiamò il labbro dorsale del blastoporo anche "organizzatore primario", in quanto esso è capace di indurre la formazione del tubo neurale e del mesoderma dorsale e di indurre una serie di eventi che portano alla formazione degli assi antero-posteriore e dorso-ventrale. L'organizzatore primario corrisponde al nodo primitivo dell'embrione umano.

la loro posizione strategica nell'ipoblasto, esprimono diversi fattori di trascrizione quali **Goosecoid**, **OTX-2** (orthodenticle homeobox 2), **HEX** (hematopoietically expressed homeobox), **LIM-1** (lim isl mec1) e **HFN3β** (hepatocyte nuclear factor 3β), nonché proteine secretorie **CER-I** (cerberus 1 homolog) e **Lefty 1,** necessari a delimitare la regione dove si formeranno strutture della testa dell'embrione. Difatti, grazie all'uso di embrioni di topo mutanti per questi fattori di trascrizione e anche per altre molecole come il trasduttore intracellulare **SMAD2** (mothers against decapentaplegic homolog 4) e il recettore dell'Attivina (**ActRIB**), è stato dimostrato che segnali provenienti dalla regione dell'AVE sono necessari per prevenire lo sviluppo di strutture posteriori nella regione anteriore dell'epiblasto e permettere lo sviluppo di strutture nella regione posteriore a questi segnali, tra cui la linea primitiva, la formazione dell'endoderma definitivo e del mesoderma intraembrionale. In particolare, **CER-I** e **Lefty** presentano un'azione biologica antagonista a fattori di crescita della famiglia del **TGF-β** (transforming growth factor-β) quali **Nodal** (così denominato perché espresso nel nodo primitivo) e **BMP** (bone morphogenetic proteins) nonché alcuni membri della famiglia **WNT** (wingless and int), che secreti da tessuti extraembrionali e dalle stesse cellule della linea primitiva e poi del nodo, inducono per l'appunto strutture nella regione posteriore dell'epiblasto. In questo modo, si viene a determinare un gradiente funzionale di fattori di crescita che posteriorizzano, elevato nella regione caudale e basso nella regione craniale dell'epiblasto (Fig. 10-12).

In un modello sperimentale murino la perdita di **Nodal** risulta, infatti, nella mancanza di formazione del mesoderma e morte dell'embrione nelle prime fasi della gastrulazione.

È stato quindi ipotizzato che una cascata molecolare, che coinvolge i fattori di trascrizione espressi dalle cellule dell'AVE e le molecole **SMAD2** e **ActRIB**, sia in grado di regolare l'espressione di due proteine, secrete dall'AVE e antagonisti di **Nodal** e **BMP4**, le proteine **CER-I** e **Lefty**. Quindi, molecole secrete dall'AVE diffondono verso l'adiacente epiblasto antagonizzando gli effetti di **Nodal**, **BMP4** e **WNT**, e delimitando quindi la regione dove si formerà la linea primitiva all'epiblasto posteriore (Fig. 10-12). In questo modo, segnali provenienti dall'AVE permettono alle regioni anteriori dell'epiblasto di sviluppare in strutture neurali anteriori e determinare la formazione della testa in un ambiente privo di segnali posteriori.

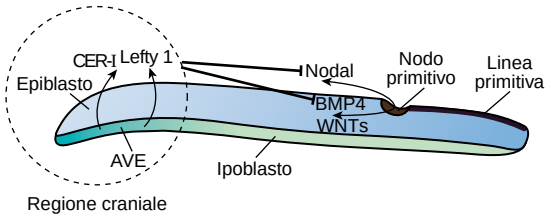



**Figura 10-12** ■ Disegno schematico che rappresenta una sezione sagittale di un embrione attraverso il nodo e la linea primitiva. L'asse antero-posteriore è determinato da un'area, l'endoderma viscerale anteriore (AVE), le cui cellule secernono le proteine CER-I e Lefty 1 che diffondono verso l'adiacente epiblasto antagonizzando gli effetti di nodal, BMP-4 e WNT che presentano un'attività anti-neurale. I segnali provenienti dall'AVE permettono, quindi, alle regioni anteriori dell'epiblasto di sviluppare determinando la regione dove si formerà la testa in un ambiente privo di segnali posteriori.

### Determinazione dell'asse dorso-ventrale

La determinazione dell'asse dorso-ventrale (D-P) dell'embrione sembra iniziare nella blastocisti ancora prima dell'impianto per essere quindi definitivamente specificata da molecole rilasciate dal nodo di Hensen e dalla notocorda. Nella blastocisti la posizione dell'ICM rispetto al blastocele determina la formazione di un asse embrionale (regione dove si trova l'ICM) – abembrionale (regione del blastocele). Successivamente le cellule dell'ICM a contatto con il liquido del blastocele formeranno l'**ipoblasto** (regione ventrale), mentre quelle a contatto con il trofoblasto, l'**epiblasto** (regione dorsale). Con il proseguire dello sviluppo, fattori di crescita secreti dal nodo primitivo di Hensen (in particolare nodal e BMP4) e molecole secrete dalla notocorda da esso originata (in particolare antagonisti di BMP4 come **chordin**, **noggin** e **follistatin** [**cordina**, **noggina** e **follistatina**]) determinano un gradiente D-V di BMP4 basso dorsalmente ed elevato ventralmente (Fig. 10-13).

### Determinazione dell'asse destro-sinistro

La lateralizzazione o asimmetria destra-sinistra (D-S), l'ultimo dei tre assi ad essere determinato, si stabilisce su pre-esistenti informazioni posizionali degli assi antero-posteriore e dorso-ventrale. Questo evento critico nell'organizzazione spaziale dell'embrione e nella determinazione dello sviluppo asimmetrico dei visceri sui lati destro e sinistro del corpo, sembra controllato da un

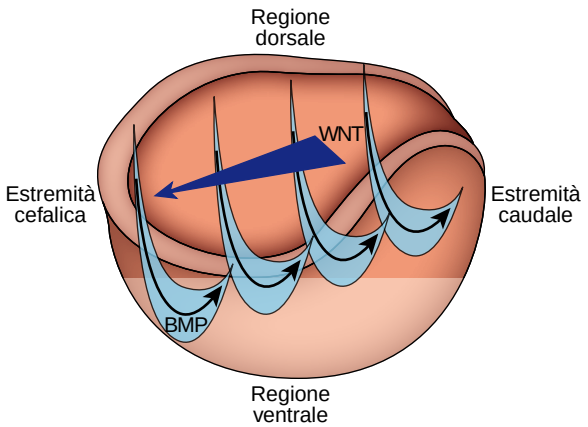



**Figura 10-13** ■ Formazione dei gradienti di fattori proteici diffusibili quali BMP4, elevato nella regione ventrale e basso nella regione dorsale, e di WNT, elevato nella regione caudale, nella determinazione dell'asse dorso-ventrale dell'embrione.

evento iniziale (**symmetry-breaking event**) non ancora chiaramente identificato che induce una complessa cascata di modificazioni epigenetiche della cromatina e di attivazione genica nelle cellule coinvolte. Molecole quali **Nodal** e **Lefty** e il gene omeotico ***Pitx2*** (paired-like homeodomain transcription factor 2), responsabile della stabilizzazione della lateralità sinistra, la cui espressione è direttamente regolata da nodal e lefty, evolutivamente conservate ed espresse specificatamente sul lato sinistro del mesoderma laterale, sono considerate i fattori responsabili per lo sviluppo dell'asimmetria destra-sinistra.

Anche se il quadro completo di come sia generata l'asimmetria D-S non è noto in dettaglio, ci sono tuttavia forti evidenze sul coinvolgimento delle monociglia o ciglia primarie presenti sulle cellule del lato ventrale del nodo primitivo (Fig. 10-14). Il **ciglio primario** è uno speciale singolo ciglio con una caratteristica organizzazione microtubulare 9 + 0 (manca la coppia di microtubuli centrale presente nelle comuni ciglia vibratili e nel flagello), in genere non dotato di mobilità, identificato oggi in diversi tipi di cellule. Il ciglio primario è considerato una struttura meccano-recettrice anche in grado di partecipare a segnalazioni intracellulari generate da certi fattori di crescita. A differenza di altre cellule, le cellule centrali della regione ventrale del nodo sono dotate di un monociglio mobile per la presenza di dineina e chinesina il cui movimento – probabilmente per la loro struttura 9+0 – è insolitamente di tipo rotazionale. La peculiare rotazione rapida in senso orario delle ciglia presenti sulle cellule della regione centrale del nodo genera un movimento del fluido extraembrionale verso sinistra (**flusso nodale**) in grado di creare un gradiente di fattori solubili sul lato sinistro. Morfogeni quali **Sonic Hedgehog** e **Indian Hedgehog**, necessari per l'induzione dell'espressione di nodal sul lato sinistro dell'embrione, potrebbero così lateralizzarsi a sinistra del nodo primitivo proprio grazie all'azione del flusso nodale generato dalle ciglia (Fig. 10-15). Recenti ricerche nel topo hanno dimostrato però che la formazione dei gradienti di morfogeni potrebbe non essere la causa primaria dell'espressione asimmetrica di geni alla base dello sviluppo dell'asse D-S. È stato dimostrato, infatti, che alla periferia del nodo, intorno alle cellule monocigliate con ciglia mobili, è presente una corona di cellule con ciglia primarie (immobili) che fungono da meccanorecettori del flusso nodale. In questo modello, le monociglia mobili causano un flusso nodale di fluido che induce a sua volta un incremento di calcio nelle cellule del lato sinistro del nodo: la deflessione del monociglio immobile sulle cellule del lato sinistro causa l'apertura di **canali del calcio** (denominati PKD2, polycystic kidney disease 2) localizzati proprio sul plasmalemma del ciglio e l'aumento di ioni $Ca^{2+}$ nel citoplasma delle cellule sarebbe quindi il segnale per l'attivazione di specifici geni (Fig. 10-16). A sostegno di questo modello, si deve sottolineare che solo le ciglia mobili esprimono il motore microtubulare della proteina dineina LRD (left right dynein) ed, inoltre, esperimenti di imaging dei livelli di calcio citoplasmatico hanno dimostrato un asimmetrico flusso di calcio proprio nelle cellule del lato sinistro del nodo primitivo. Ulteriori studi hanno messo in evidenza che il flusso nodale determina certamente un gradiente D-S di morfogeni, come sonic hedgehog (SHH) e acido retinoico, ma queste molecole si trovano all'interno di **microvescicole** (NVP, nodal vescicular particles) prodotte e riversate nell'ambiente extracellulare dalle cellule del nodo; il flusso asimmetrico verso sinistra di queste microvescicole induce un incremento di calcio nelle cellule del lato sinistro del nodo. Tali evidenze sperimentali confermano il ruolo fondamentale delle monociglia mobili e delle ciglia primarie con funzione meccanorecettoriale (**modello meccanosensoriale**) nella determinazione dell'asse D-S.

**Figura 10-14** ■ Immagine ottenuta al microscopio confocale di cellule epiteliali del lato ventrale del nodo primitivo di un embrione allo stadio di due somiti. Il nodo primitivo costituisce un fondamentale centro organizzativo che determina la formazione dell'asse corporeo D-S. La tubulina delle ciglia è mostrata in verde ed è presente sulla superficie apicale delle cellule del nodo. I filamenti di actina sono decorati in rosso con la falloidina e i nuclei delle cellule sono marcati in blu con il TOPRO-3. La colorazione gialla si ottiene dalla sovrapposizione dei segnali dell'actina e della tubulina. (Riprodotta con il permesso del prof. Terry P. Yamaguchi, Center for the Cancer Research.)

L'importanza del ruolo delle ciglia del nodo primitivo è documentato anche da un'anomala condizione denominata ***situs inversus viscerum*** in cui è presente una patologica inversione di posizione destra-sinistra degli organi toracici e/o addominali rispetto al normale (descritta nell'uomo e nel topo). Sono state descritte, infatti, mutazioni del motore microtubulare della dineina assonemica che causano immobilità delle ciglia del nodo e quindi assenza di flusso nodale, che sono quindi alla base dell'inversione di posizione degli organi. È interessante notare che in presenza di questa mutazione della dineina, l'espressione regionalizzata D-S delle proteine Nodal, Lefty e PITX2 è completamente alterata, indicando chiaramente che la regolazione di questi fattori è a valle della funzione della dineina delle ciglia mobili.

Molto recentemente, alcuni dati ottenuti in modelli sperimentali dello sviluppo embrionale dimostrano chiaramente il coinvolgimento del neurotrasmettitore **serotonina** negli eventi iniziali della determinazione dell'**asimmetria D-S**, già nelle primissime divisioni mitotiche dei blastomeri subito dopo la fecondazione. La redistribuzione asimmetrica della serotonina (sul lato destro dell'embrione) durante la formazione dei primi

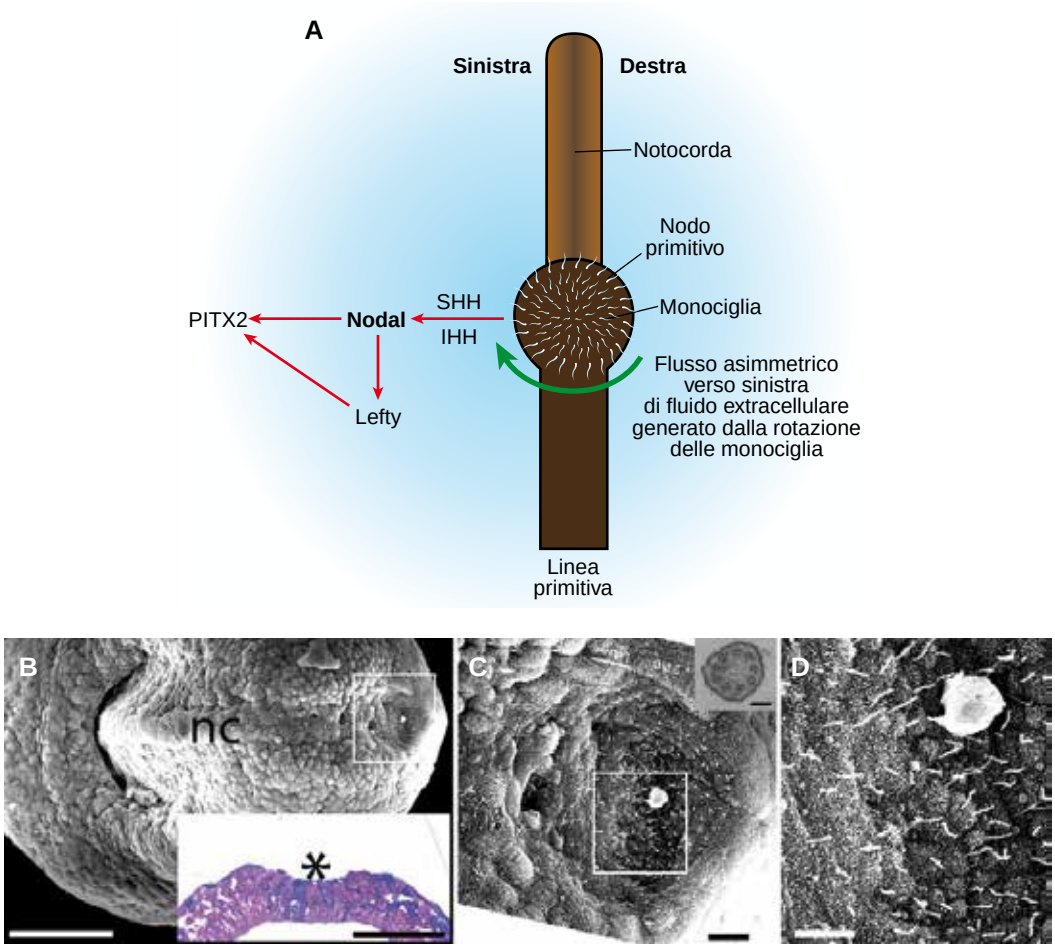



**Figura 10-15** ■ *A)* L'asimmetria destra-sinistra è inizialmente generata dalla rotazione delle monociglia presenti sulle cellule del lato ventrale del nodo primitivo. Il flusso asimmetrico di fluido induce la presenza di morfogeni quali sonic hedgehog (SHH) e indian hedgehog (IHH) sul lato sinistro dell'embrione determinando, quindi, l'espressione regionalizzata di Nodal e Lefty che stimolano a sua volta l'espressione di PITX2, un fattore di trascrizione responsabile della stabilizzazione della lateralità sinistra. *B,C,D)* Fotografie al microscopio elettronico a scansione che mostrano il lato ventrale del nodo primitivo di topo dove sono evidenti le cellule dotate di singole ciglia. La regione all'interno del rettangolo bianco è ingrandita nell'immagine successiva. Gli inserti in *B* (in basso a destra) e *C* (in alto a destra) rappresentano, rispettivamente, una foto al microscopio ottico di una sezione trasversale del nodo ventrale e un'immagine al microscopio elettronico di una sezione trasversale di monociglia con un'organizzazione microtubulare 9+0. (*Da* Y. Okada e coll., Mechanism of nodal flow: a conserved symmetry breaking event in left-right axis determination, Cell 121, 4, 2005, per gentile concessione).

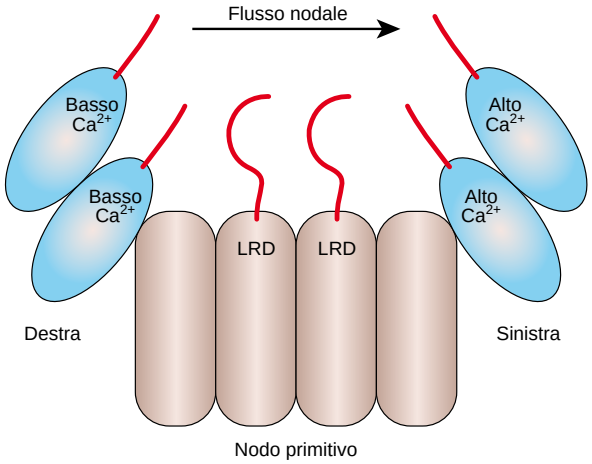



**Figura 10-16** ■ Le monociglia delle cellule del nodo generano il flusso nodale e funzionano anche da meccanorecettori dello stesso flusso. Le monociglia presenti sulle cellule al centro del nodo (rettangoli) generano un flusso nodale (indicato dalla freccia) che viene percepito dalle monociglia immobili delle cellule periferiche del nodo (ellittiche) che funzionano quindi da meccanorecettori. Le cellule centrali presentano lunghe ciglia mobili la cui attività di movimento è dipendente dal motore microtubulare della proteina dineina (left-right dynein, LRD). L'effetto di questo movimento di fluido è quello di generare un flusso verso sinistra, il quale è in grado di piegare le monociglia meccanorecettrici non mobili (linee dritte sulle cellule ellittiche). La deflessione delle ciglia meccanorecettrici causa un incremento di calcio intracellulare attivando un "programma di lateralità sinistra" che porta a un'espressione genica asimmetrica.

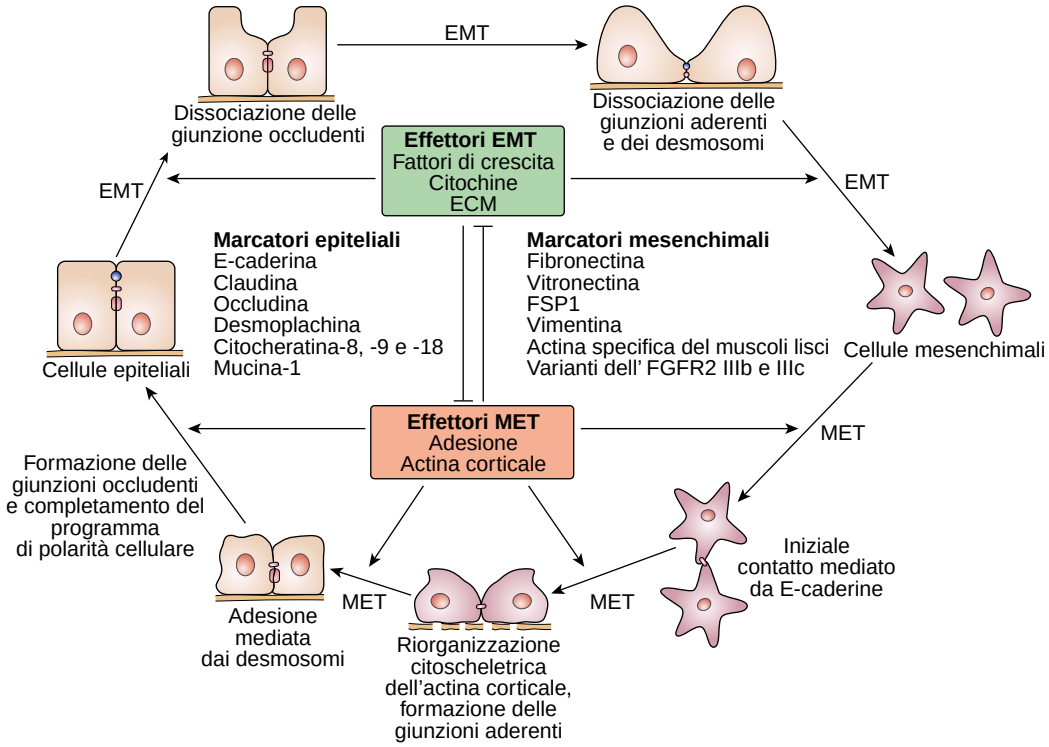



**FIGURA 10-17** ■ Rappresentazione schematica che mostra il ciclo di eventi che avviene nel corso della transizione da cellula epiteliale a cellula mesenchimale e viceversa. I diversi stadi del processo di EMT (transizione epitelio-mesenchimale) e del processo opposto di MET (transizione mesenchima-epiteliale) sono regolati da effettori della EMT e della MET che si influenzano reciprocamente. ECM, matrice extracellulare; FGFR2, recettore di tipo 2 dell'FGF.

blastomeri costituisce uno degli eventi iniziali della perdita di simmetria ben prima del flusso nodale azionato dalle monociglia delle cellule del nodo. L'identificazione del meccanismo molecolare e del controllo spazio-temporale attraverso cui la serotonina esercita la sua azione nella determinazione dell'asse D-S, ha un impatto clinico importante sull'effetto di farmaci, modulatori della via serotonergica di ampio utilizzo medico, nello sviluppo embrio-fetale. In questo modello il **symmetry-breaking event** è rappresentato dall'esistenza di strutture chirali (dissimetriche) nel citoscheletro dell'embrione (chiralità citoscheletrica) fin dallo stadio embrionale a due cellule, e questo favorisce la conseguente distribuzione asimmetrica di proteine quali, canali del $K^+$ e pompe protoniche $H^+$; questa asimmetria comporta differenze nel pH e nel voltaggio transmembrana tra cellule del lato sinistro e destro dell'embrione. I gradienti bioelettrici, che si sono così venuti a creare, generano una distribuzione asimmetrica di piccole molecole cariche, come la **serotonina**, attraverso le giunzioni comunicanti, dalle cellule del lato sinistro alle cellule del lato destro di un embrione nelle primissime fasi di sviluppo. L'accumulo di serotonina sul lato destro dell'embrione causa la repressione dell'espressione del marcatore del lato sinistro, il fattore di crescita nodal.

Una teoria che unifica la grande quantità di dati sperimentali sull'origine dell'asimmetria D-S suggerisce che eventi molto precoci (chiralità citoscheletrica e distribuzione asimmetrica della serotonina), che avvengono già allo stadio delle prime divisioni mitotiche, costituiscono gli eventi iniziali di origine dell'asimmetria; il flusso nodale delle monociglia, conseguente al "symmetry-breaking event", funziona quindi come meccanismo di amplificazione e propagazione dell'asimmetria D-S.

## *Regolazione della transizione epitelio-mesenchimale primaria (induzione del mesoderma)*

Come abbiamo visto, la **transizione epitelio-mesenchimale (EMT)** è una complessa manifestazione della plasticità epiteliale che porta ad un drammatico cambiamento fenotipico delle cellule con perdita della polarità, rimodellamento delle giunzioni cellula-cellula e cellula-matrice, riorganizzazione citoscheletrica, acquisizione di motilità, invasività, elevata resistenza all'apoptosi e un notevole incremento nella produzione di molecole della matrice extracellulare (Fig. 10-17). La plasticità fenotipica osservata nella EMT è inoltre dimostrata dalla manifestazione del processo inverso, la **transizione mesenchima-epiteliale (MET)** che implica la conversione di cellule mesenchimali in derivati epiteliali. Alcuni specifici processi molecolari sono coinvolti nell'innesco e

nella terminazione del processo di EMT. Questi processi molecolari includono l'attivazione di fattori di trascrizione, l'espressione di specifiche proteine della membrana plasmatica, riorganizzazione ed espressione di proteine citoscheletriche, produzione di enzimi di degradazione delle molecole della matrice extracellulare nonché modificazioni nell'espressione di specifici microRNA. La EMT che avviene durante l'impianto, l'embriogenesi e lo sviluppo degli organi è stata definita **EMT di tipo 1** e dà origine al mesoderma e all'endoderma e alle cellule migranti della cresta neurale durante la gastrulazione; la EMT di tipo 2 è associata a processi infiammatori, riparazione di ferite, rigenerazione tissutale e fibrosi mentre la EMT di tipo 3 è quella delle cellule neoplastiche che sono andate incontro a modificazioni genetiche ed epigenetiche con l'acquisizione di un fenotipo maligno. Una mutua interazione di differenti stimoli extracellulari inclusi componenti della matrice extracellulare nonché fattori solubili quali membri della famiglia del **TGF-β** e dell'**FGF** (fibroblast growth factor), **EGF** (epidermal growth factor) e **HGF** (hepatocyte growth factor) sono responsabili dell'induzione del processo di transizione epitelio-mesenchimale. Le tre classi di EMT rappresentano, tuttavia, processi biologici distinti con un comune set di elementi genetici e biochimici, anche se i meccanismi di induzione e progressione dei differenti processi di EMT presentano importanti differenze nei diversi contesti biologici in cui avvengono. A livello biochimico, la EMT associata con la gastrulazione è dipendente dall'azione dei fattori **WNT** ed infatti embrioni privi del fattore WNT3 non vanno incontro a EMT durante la gastrulazione. Le proteine della famiglia del **TGF-β**, come **Nodal** e **VG1** (vegetative 1), mediano l'azione di WNT3, e la loro deficienza causa difetti di formazione del mesoderma per un alterato processo di EMT. Bisogna aggiungere che i fattori Wnt cooperano con i recettori dell'FGF per regolare il processo di EMT durante la gastrulazione. Inoltre, alcuni fattori di trascrizione sono stati implicati come effettori finali in questo processo differenziativo. In particolare, membri della famiglia di repressori trascrizionali **Snail/Slug** reprimono l'espressione di E-caderina e inducono transizione epitelio-mesenchimale quando espressi artificialmente ad alto livello nelle cellule epiteliali. La conferma di questo ruolo critico viene anche dallo studio di topi "knockout" che dimostrano come la perdita del gene ***Snail*** nel topo causa la morte dell'animale al tempo della gastrulazione (gli animali presentano un difettoso processo di transizione epitelio-mesenchimale con la formazione di un anomalo strato di mesoderma).

Più recentemente è stato dimostrato che l'**ipossia** è una condizione microambientale che riveste un ruolo critico anche nel corso dello sviluppo. Una bassa tensione di ossigeno (ipossia), infatti, causa l'attivazione e/o la stabilizzazione dei fattori di trascrizione **HIF-1** (hypoxia inducible factor-1) responsabili a loro volta della transizione epitelio-mesenchimale attraverso la regolazione coordinata dell'espressione di differenti fattori (tra i quali il fattore di trascrizione **Twist** che induce la repressione dell'espressione di E-caderina). È importante sottolineare che lo studio del processo di transizione epitelio-mesenchimale è fondamentale non solo nel corso dell'embriogenesi ma anche nella progressione dei tumori epiteliali maligni con la formazione delle metastasi.

## *Meccanismi regolatori dell'induzione neurale e della formazione della cresta neurale*

Le recenti scoperte sul coinvolgimento di fattori induttivi nella formazione del mesoderma ha permesso anche di iniziare a capire le basi molecolari e cellulari dell'**induzione neurale**. Alcune delle molecole implicate nell'induzione del mesoderma, infatti, hanno anche un ruolo nell'induzione neurale. Il nodo primitivo e il mesoderma cordale della notocorda rilasciano alcune molecole note come **Noggin**, **Chordin** e **Follistatin** (**Noggina**, **Cordina** e **Follistatina**) che hanno la funzione di induttori neurali. Tali fattori sono stati inizialmente identificati come responsabili della dorsalizzazione del mesoderma (mesoderma parassiale). La funzione di induzione neurale di queste tre molecole risiede nella loro proprietà di inibire l'attività biologica delle proteine **BMP**. La soppressione nel posto e nel momento giusto della funzione delle **BMP**, membri della famiglia del TGF-β che hanno una forte attività anti-neurale e di ventralizzazione del mesoderma, causa l'induzione della placca neurale; la sua piena attività biologica nei tessuti dell'embrione in gastrulazione, al contrario, determina la formazione dell'epidermide dall'ectoderma e la formazione del mesoderma ventrale (mesoderma intermedio e laterale). L'induzione neurale è raggiunta, quindi, attraverso l'inibizione dei segnali mediati dalle **BMP**. Bisogna aggiungere, tuttavia, che questi induttori neurali (noggin, chordin e follistatin) sono responsabili della sola formazione del tessuto neurale anteriore (prosencefalo e mesencefalo). Altri fattori descritti come responsabili dell'induzione neurale posteriore (rombencefalo e midollo spinale) sono **FGF** (fibroblast growth factor), **acido retinoico** e **WNT-3a**. La polarità dorso-ventrale del sistema nervoso centrale viene poi regolata dai tessuti circostanti: della notocorda (attraverso la secrezione di **SHH**, **Noggin** [**Noggina**] e **Chordin** [**Cordina**]) e dell'ectoderma (attraverso la secrezione di **BMP**, **WNT** e **Tiarin** [**Tiarina**]). La differenziale identità dorso-ventrale dei neuroni del tubo neurale viene quindi ad essere determinata da opposti gradienti di una complessa varietà di fattori solubili (vedi Capitolo 13).

Da quanto descritto, risulta evidente di come il modellamento dell'ectoderma neurale, così come il mesoderma, richieda l'azione coordinata nel tempo e nello spazio di più di un singolo fattore. Tuttavia, l'identificazione di tutti i fattori coinvolti, i loro specifici ruoli e la comprensione dei relativi meccanismi di regolazione spazio-temporale del processo induttivo è un traguardo non ancora raggiunto.

Come abbiamo visto, alla fine il tubo neurale formerà un cilindro chiuso che si è separato dall'ectoderma sovrastante. Questo processo di separazione è mediato da una differenziale espressione di molecole di adesione. Le cellule che entreranno a far parte del tubo neurale esprimono inizialmente E-caderina, ma una volta che il tubo

neurale si è formato, si blocca la sintesi di questa proteina e sintetizzeranno invece N-caderina e N-CAM (neural-cell adhesion molecule). In conseguenza di tale cambiamento le cellule dell'ectoderma e le cellule del tubo neurale non saranno più legate le une alle altre in quanto esprimono isoforme differenti di caderina.

Le **cellule della cresta neurale** (**NC**, **neural crest**) sono inizialmente indotte da una serie di segnali che avvengono proprio al confine tra l'ectoderma neurale in formazione (neuroectoderma) e quello non neurale. Successivamente le cellule della NC vanno incontro a un processo di perdita di adesione cellula-cellula, riarrangiamento citoscheletrico e modificazioni morfologiche che le permetterà di delaminare e staccarsi dal neuroectoderma del tubo neurale (transizione epitelio-mesenchimale). Nello stesso momento, queste cellule acquisiranno capacità migratorie attraverso la produzione di metalloproteasi (enzimi proteolitici responsabili della degradazione e rimodellamento della matrice extracellulare e dipendenti da ioni metallici per la loro attività catalitica) e specifici recettori di membrana, che gli permetteranno di rispondere a molecole segnale presenti nel micro-ambiente orientando così le loro vie di migrazione. Questa complessa successione di eventi, dall'induzione delle creste neurali al differenziamento delle cellule NC è regolato da una serie di geni regolatori (vedi Capitolo 13).

Le cellule localizzate al confine della placca neurale sono inizialmente indotte a divenire cellule della NC da molecole quali **BMP**, **WNT** e **FGF**. È stato proposto che l'esposizione, delle cellule più laterali del neuroectoderma, a livelli intermedi di **BMP** rende competenti tali cellule all'azione dei **WNT** (prodotti dall'ectoderma non neurale e dal mesoderma parassiale) e di **FGF** (prodotto dal mesoderma parassiale), che a sua volta inducono l'espressione di fattori di trascrizione come **PAX3** (paired box 3) e **ZIC1** (zinc finger protein of the cerebellum 1) (Fig. 10-18). Quest'ultimi mediano, quindi, l'espressione di una serie di molecole responsabili del differenziamento delle cellule del neuroectoderma in cellule della NC; alcune di queste molecole sono dei regolatori trascrizionali come **Snail** e **FoxD3** (forkhead box D3) (responsabili del cambiamento fenotipico delle cellule NC noto come transizione epitelio-mesenchimale).

Esempi di malattie dovute a difetti di induzione o migrazione delle cellule delle creste neurali sono il **piebaldismo** (un'ipomelanosi congenita) e la **malattia di Hirschsprung** o **megacolon congenito agangliare**. Per ulteriori informazioni sullo sviluppo delle cellule delle creste neurali consulta il Capitolo 13.

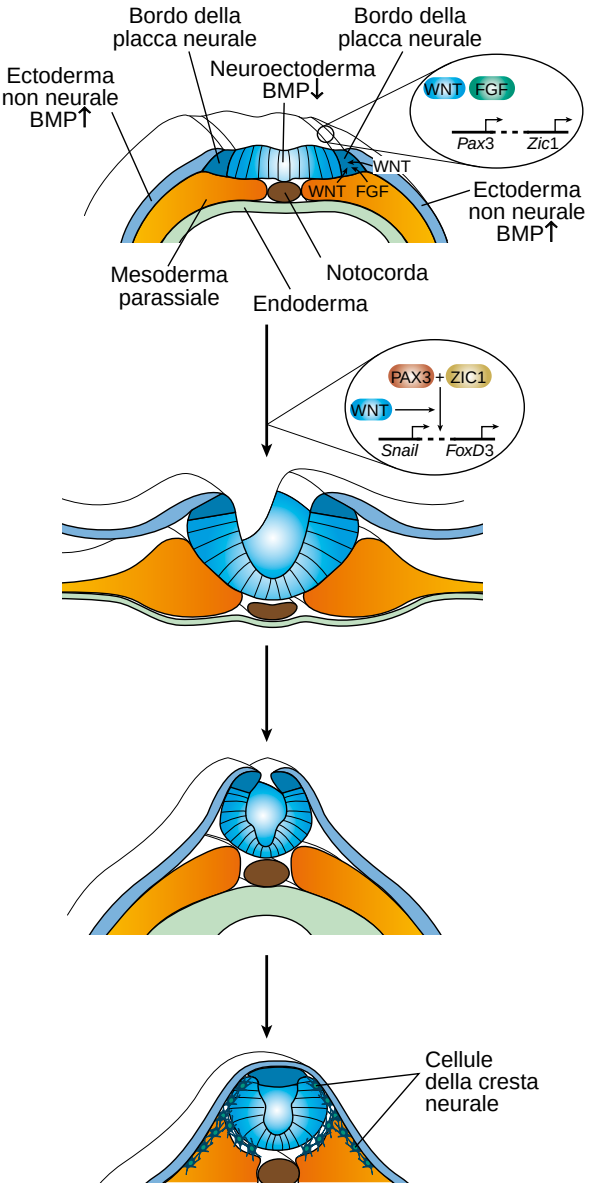



**Figura 10-18** ■ Processi regolativi nella formazione delle cellule della cresta neurale. Il processo induttivo inizia al confine della placca neurale ed è mediato da FGF (secreto dal sottostante mesoderma parassiale) e da WNT (secreto dall'ectoderma non neurale e dal mesoderma parassiale). Livelli intermedi di BMP rendono competenti le cellule di confine all'azione di WNT e FGF che a sua volta inducono l'espressione dei fattori di trascrizione PAX3 e ZIC1. Quest'ultimi, in modo dipendente da WNT, aumentano i livelli dei regolatori trascrizionali snail e FoxD3, che sono i principali determinanti della formazione delle cellule della cresta neurale.

## ASPETTI CLINICI E MALFORMAZIONI

### *La madre*

L'inizio della 3ª settimana è caratterizzato, nella madre, da un evento di capitale importanza; l'**amenorrea**. È il primo segno obiettivo di gravidanza. Il corpo luteo non è andato incontro a regressione e continua a produrre elevati livelli di progesterone che mantengono bloccata l'ipofisi nel produrre FSH e LH. Inoltre compaiono i cosiddetti "piccoli segni di gravidanza": tensione e turgore dei seni, costipazione e pollachiuria (frequenze minzione diurna), nausea e vomito. Questi sono segni incostanti, ma di grande valore diagnostico. Nel siero e nelle urine della madre livelli di **hCG** sono in aumento e possono

facilmente essere rilevati con un buon test immunologico (segni biologici di gravidanza), oggi acquistabile in tutte le farmacie (vedi Capitolo 8).

## Teratogeni e malformazioni

Il periodo embrionale è la fase dell'organogenesi nel quale si formano la maggioranza degli organi ed apparati (vedi Capitolo 3). Pertanto, questo è anche il periodo più critico per lo sviluppo ed è anche quello nel quale si producono i maggiori difetti strutturali. La formazione degli abbozzi dei singoli organi è infatti la conseguenza di cruciali interazioni tra cellule staminali pluripotenti nello specifico microambiente, e queste interazioni sono particolarmente sensibili a influenze genetiche e insulti teratogeni ambientali.

In particolare, anomalie della gastrulazione coinvolgono le due strutture di transizione, notocorda e linea primitiva, che possono portare ad alcune anomalie dello sviluppo qualora non venissero completamente riassorbite.

Una serie di malformazioni associate di differenti organi comprende un gruppo di sindromi che oscillano da piccole anomalie nell'area delle vertebre lombosacrali a una condizione estrema caratterizzata dalla completa fusione degli arti inferiori (**sirenomelia**). Questo spettro variabile di difetti è stato identificato come sindrome della **displasia caudale**.

In alcuni casi le malformazioni caudali si associano anche con anomalie in posizione più cefalica. In tale caso, questa particolare sindrome è stata denominata **associazione VATER**, un acronimo ad indicare che essa comprende anomalie vertebrali e vascolari, atresia anale, fistola tracheo-esofagea, atresia esofagea, difetti renali. L'eterogeneità delle anomalie della displasia caudale preclude forse un singolo meccanismo comune di origine. Tuttavia queste malformazioni sono la conseguenza di un difetto di crescita e produzione di mesoderma nella regione più caudale dell'embrione nonché di una migrazione disturbata di cellule mesodermiche durante la 3ª settimana.

In altri casi si osservano tumori conseguenti a difetti della gastrulazione: **teratoma sacro-coccigeo** e **cordoma**. I teratomi sacro-coccigei si formano da residui della linea primitiva che in condizioni normali degenerano e vengono riassorbiti. Questi residui sono costituiti di cellule pluripotenti che proliferano e formano masse tumorali che frequentemente contengono tessuti derivati da tutti e tre i foglietti embrionali e potrebbero contenere osso, capelli, denti, cellule nervose ecc. I teratomi sono tre volte più frequenti nel sesso femminile e possono divenire maligni già in età infantile e quindi devono essere rimossi il prima possibile.

Il cordoma è un tumore raro che deriva da residui della notocorda e origina dalle ossa della base del cranio o a livello della colonna vertebrale sacrale. È un tumore apparentemente benigno a lenta crescita. Tuttavia il cordoma può invadere l'osso circostante, comprimendo e danneggiando le strutture nervose adiacenti. Appare generalmente intorno al 50° anno di età e si manifesta con disturbi dei nervi cranici (doppia visione, nevralgia trigeminale, sordità, ecc.).

Tra i comuni **teratogeni** in grado di alterare processi che avvengono durante questo periodo una speciale menzione spetta all'**etanolo**. La terza causa di ritardo mentale dopo la sindrome di Down e la sindrome dell'X fragile è, infatti, rappresentata dalla **sindrome feto-alcolica** (FAS). Un'assunzione di alcol, da parte di una donna in gravidanza, durante il periodo della gastrulazione (uno stadio che viene raggiunto a circa 4-5 settimane dall'ultima mestruazione) è causa di anomalie nella migrazione dei neuroni e delle cellule della cresta neurale provocando quindi una serie di difetti somatici e deficit cognitivo nei bambini con FAS conseguente a un ridotto sviluppo del cervello. Uno dei possibili meccanismi con cui l'etanolo esercita il suo effetto teratogeno potrebbe essere ricondotto ad una sua azione indiretta di inibizione della produzione di acido retinoico attraverso un effetto inibitorio sull'enzima alcol deidrogenasi (enzima che converte la vitamina A o retinolo in un composto intermedio che diventerà acido retinoico). L'acido retinoico è un importante morfogeno derivato dalla vitamina A che ha un ruolo fondamentale per il normale sviluppo e una corretta morfogenesi del sistema nervoso e degli arti.

## Bibliografia citata nel testo e letture consigliate

Cleaver O, Krieg P. Nothocord patterning of the endoderm. Developmental Biology 234, 1-12, 2001.

Gasser RF. Atlas of human embryos. Harper & Row, 1975.

Gauldel J, Reiter JF. Neur-ons and neur-offs: regulators of neural induction in vertebrate embryos and embryonic stem cells. Human Molecular Genetics 17, R60-R66, 2008.

Gilbert SF. Developmental Biology. 8ª ed., Sinauer, 2006.

Jirasek JE. An atlas of the human embryo – A photographic view of human prenatal development. Informa Healthcare, London, 2001.

Johnson MH. From mouse egg to mouse embryo: polarities, axes, and tissues. Annu Rev Cell Dev Biol 25, 483-512, 2009.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. The Journal of Clinical Investigation 119 (6):1420-1428, 2009.

Kimelman D. Mesoderm induction: from caps to chips. Nature Reviews Genetics 7, 360-372, 2006.

Levine AJ, Brivanlou AH. Proposal of a model of mammalian neural induction. Developmental Biology 308, 247-256, 2007.

O'Rahilly R., Müller F. The first appearance of the human nervous system at stage 8. Anatomy and Embryology 163, 1-13, 1981.

O'Rahilly R, Müller F. Developmental stages in human embryos: including a revision of Streeter's horizons and a survey of the Carnegie collection. Carnegie Institution of Washington, Washington DC, 1987.

Okada Y e coll. Mechanism of nodal flow: a conserved symmetry breaking event in left-right axis determination. Cell 121, 633-644, 2005.

Perea-Gomez A e coll. Role of the anterior visceral endoderm in restricting posterior signals in the mouse embryo. Int J Dev Biol 45, 311-320, 2001.

Perez-Pomares JM, Munoz-Chapuli R, Epithelial-mesenchimal transitions: a mesodermal cell strategy for evolutive innovation in metazoans. The Anatomical Record 268, 343-351, 2002.

Raya A, Izpisua Belmonte JC. Insights into the establishment of left-right asymmetries in vertebrates. Birth Defects Research 84, 81-94, 2008.

Rivera-Perez JA. Axial specification in mice: ten years of advances and controversies. Journal of Cellular Physiology 213, 654-660, 2007.

Saraga Babić M. Development of the notochord in normal and malformed human embryos and fetuses. Int J Dev Biol 35, 345-352, 1991.

Sauka-Spengler T, Bronner-Fraser M. A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. Nature Reviews Molecular Cell Biology 9, 557-568, 2008.

Schlueter J, Brand T. Left-right axis development: examples of similar and divergent strategies to generate asymmetric morphogenesis. Cytogenetic and Genome Research 117, 256-267, 2007.

Shen M. Nodal signalling: developmental roles and regulation. Development 134, 1023-1034, 2007.

Steding G. The anatomy of the human embryo. A scanning electron microscopic atlas. S Karger AG, Basel, 2009.

Sulik K, Dehart DB, Iangaki T, Carson JL, Vrablic T, Gesteland K, Schoenwolf GC. Morphogenesis of the murine node and notochordal plate. Dev Dyn 201, 260-278, 1994.

Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. Nature Rev Molecular Cell Biology 7, 131-142, 2006.

Vandenberg LN, Lemire JM, Levin M. Serotonin has early, cilia-independent roles in Xenopus left-right patterning. Dis Model Mech 6(1), 261-268, 2013.

Vandenberg LN, Levin M. A unified model for left-right asymmetry? Comparison and synthesis of molecular models of embryogenic laterality. Dev Biol 379(1), 1-15, 2013.

Weng A, Stemple DL. Nodal signalling and vertebrate germ layer formation. Birth Defects Research 69, 325-332, 2003.

Yang Muh-Hwa e coll. Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. Nature Cell Biology 10, 295-305, 2008.

Yoshiba S, Shiratori H, Kuo IY, Kawasumi A, Shinohara K, Nonaka S, Asai Y, Sasaki G, Belo JA, Sasaki H, Nakai J, Dworniczak B, Ehrlich BE, Pennekamp P, Hamada H. Cilia at the node of mouse embryos sense fluid flow for left-right determination via Pkd2. Science 338, 226-231, 2012.

Zaffran S, Frash M. Early siganls in cardiac development. Circulation Research 91, 457-469, 2002.

Zavadil J, Bottinger EP. TGF-β and epithelial-to-mesenchimal transitions. Oncogene 24, 5764-5774, 2005.

Zhou X coll. Nodal is a novel TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation. Nature 361, 543-547, 1993.

11

# Quarta settimana di sviluppo

## Crescita e organizzazione dei derivati dei foglietti embrionali, definizione del corpo dell'embrione e inizio dell'organogenesi

Marina Bouché

La 4ª settimana di sviluppo è caratterizzata da due processi fondamentali:

- la delimitazione e la definizione della forma del corpo dell'embrione, dovuta ai ripiegamenti dell'embrione stesso, che acquisisce la forma di un cilindro ripiegato cranialmente e caudalmente;
- la crescita e l'organizzazione dei derivati dei tre foglietti embrionali, che portano alla formazione degli abbozzi di quasi tutti gli organi.

Gli eventi morfogenetici (acquisizione della forma) e organogenetici (formazione degli organi) sono eventi tra loro strettamente coordinati e avvengono in modo sincrono.

La Figura 11-1 mostra le evidenti modificazioni della forma esterna e gli abbozzi visibili esternamente di alcuni organi dell'embrione tra la 3ª e la 4ª settimana.

### LO SVILUPPO DELL'ECTODERMA

Abbiamo visto che nel corso della 3ª settimana la formazione della notocorda induce la regione dell'ectoderma sovrastante a differenziare in neuroectoderma che, organizzato prima nella placca neurale, successivamente forma la doccia neurale. Questa verso la fine della 3ª settimana inizia a formare il tubo neurale. Come già accennato nel capitolo precedente, mentre le pieghe neurali convergono fino a fondersi per formare il tubo neurale, dalla regione di fusione si staccano delle cellule che non saranno incorporate nella parete del tubo neurale, ma formeranno invece una struttura del tutto distinta, le creste neurali. Le creste neurali inizialmente formano un foglietto omogeneo, allungato, di cellule che decorre dorsalmente al tubo neurale lungo tutto l'asse cefalocaudale, interponendosi tra l'ectoderma a destino epi-

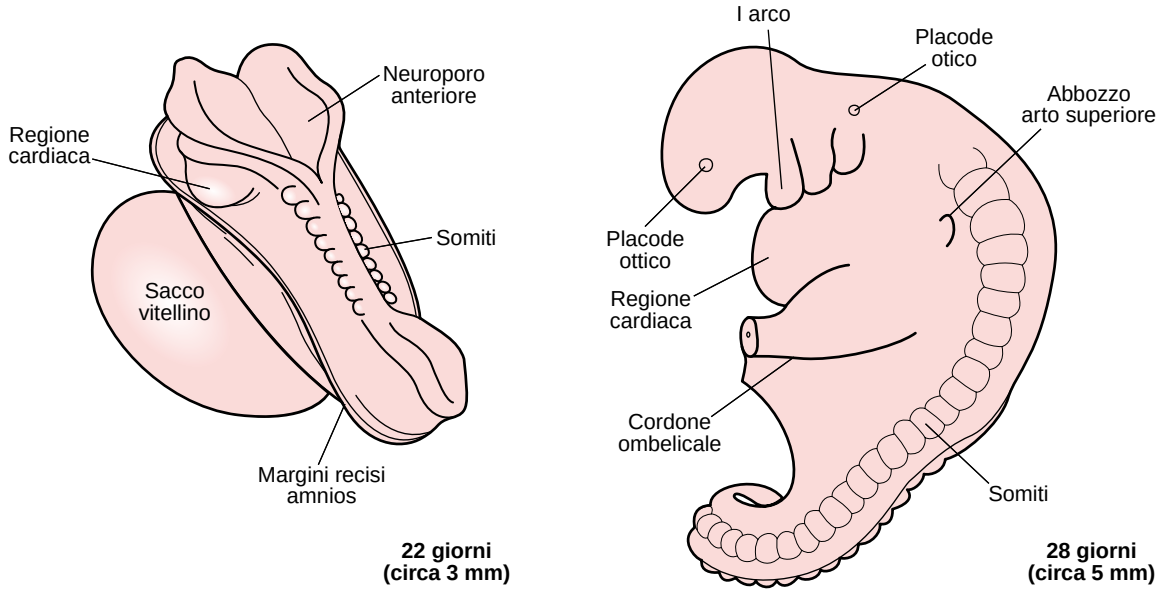



**Figura 11-1** Modificazioni della forma e organogenesi iniziale in un embrione tra la 3ª e la 4ª settimana.

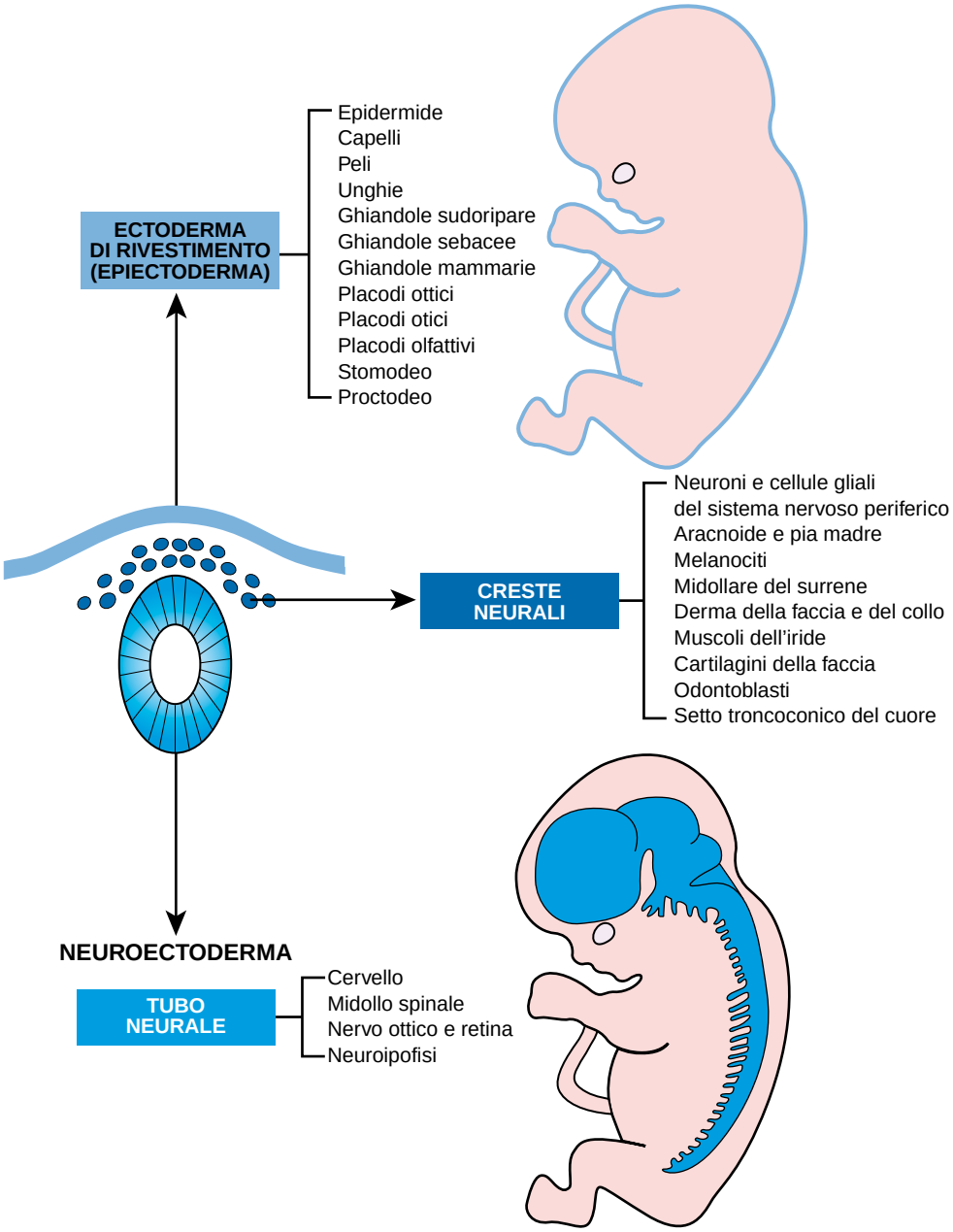



**Figura 11-2** ■ Regioni organo-formative dell'ectoderma e loro derivati.

dermico (**epiectoderma**), che si chiude al di sopra di esse, e il tubo neurale, al di sotto. Alla formazione delle creste neurali contribuiscono sia l'epiectoderma che, in maggior misura, il neuroectoderma. All'inizio della 4ª settimana quindi l'ectoderma risulta diviso in tre regioni: l'ectoderma di rivestimento chiamato epiectoderma destinato a formare l'epidermide con i suoi annessi e i placodi, il **neuroectoderma** che costituisce l'abbozzo del sistema nervoso centrale e il foglietto delle **creste neurali** interposto tra i due (Fig. 11-2).

Durante la 4ª settimana il tubo neurale, mentre si chiude completamente, sprofonda al di sotto dell'epiectoderma che si estende quindi a rivestire con un sottile strato trasparente di epidermide la superficie esterna dell'embrione. Allorché questo assume una forma cilindrica il foglietto epiectodermico lo avvolge completamente fondendosi ventralmente. Nella regione craniale l'ectoderma forma una piccola invaginazione lo **stomodeo**, la futura cavità buccale, in quella caudale un'analoga fossetta forma il **proctodeo**, la futura cavità anale. Nella regione della testa compaiono quattro ispessimenti epiectodermici pari, i **placodi ottici** e **otici**, che segnano rispettivamente l'inizio dello sviluppo degli occhi e delle orecchie (vedi Capitolo 19).

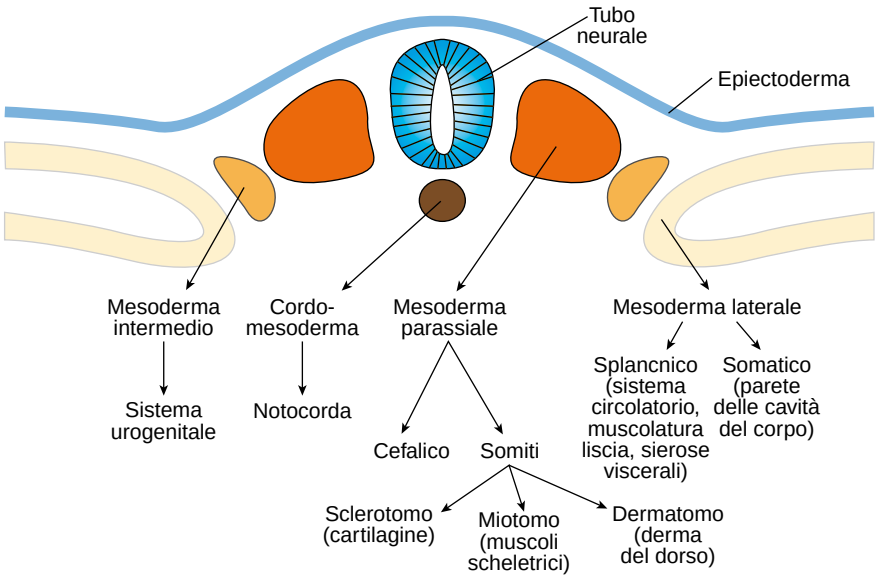



**Figura 11-3** ■ Regioni organo-formative del mesoderma e loro principali derivati.

Lo sviluppo dell'epidermide e dei suoi annessi verrà illustrato nel Capitolo 12, quello del sistema nervoso e delle creste neurali nel Capitolo 13. Qui diremo soltanto che in questo stadio cellule provenienti dalle creste neurali della regione della testa-collo migrano per formare ammassi di cellule mesenchimali che delineano al di sotto dell'ectoderma gli abbozzi dei primi tre **archi branchiali** visibili come ispessimenti al di sotto dell'epiectoderma (Figg. 11-1 e 11-11).

## LO SVILUPPO DEL MESODERMA

Come abbiamo visto nel capitolo precedente, il risultato della gastrulazione è la formazione dell'endoderma definitivo e del terzo foglietto embrionale, il mesoderma, che si interpone fra epiblasto, che diventa ectoderma, e l'endoderma definitivo. È importante sottolineare che lo sviluppo degli abbozzi degli organi di origine mesodermica e endodermica non è successivo allo sviluppo del tubo neurale, ma avviene contemporaneamente.

Il mesoderma all'inizio della 4ª settimana appare costituito da quattro regioni principali (Fig. 11-3). La prima regione è il **mesoderma cordale** organizzato nella **notocorda**, la seconda regione è il **mesoderma parassiale**, che appare formato da due cordoni di cellule che decorrono ai lati del tubo neurale, e che presto si organizzano in **somitomeri** e **somiti**; la terza regione è il **mesoderma intermedio**, la quarta è il **mesoderma laterale**, che ha iniziato a delaminarsi in **splancnopleura** e **somatopleura intraembrionali**. Queste ultime tre regioni di mesoderma sono inizialmente unite tra loro, ma nel corso dei processi morfogenetici della 4ª settimana si separano e andranno incontro a distinti processi differenziativi. Accanto a queste regioni, sono da ricordare, sempre facenti parte del mesoderma, la **placca precordale**, il **mesoderma trasverso** e l'**eminenza mediana** descritti nel Capitolo 10.

## Il mesoderma parassiale: i somiti

Il mesoderma parassiale dà origine prima ai **somitomeri** e subito dopo ai **somiti**. Si tratta di strutture metameriche ovvero di segmenti ripetitivi di eguale composizione. Nonostante siano delle strutture transitorie, determinano l'organizzazione del piano segmentato dell'embrione. La struttura metamerica iniziale del corpo viene però modificata e complicata dalla formazione della testa e degli arti, e quindi si mantiene solo nelle regioni toraciche e addominali. Come vedremo meglio più avanti, i somiti danno origine alle cellule che formano le vertebre, le costole con i muscoli annessi, il derma della cute del dorso e i muscoli della parete corporea e degli arti.

### Segmentazione del mesoderma parassiale

Durante la 3ª settimana, mentre la linea primitiva regredisce e le pieghe neurali cominciano a fondersi nella regione centrale dell'embrione, il mesoderma parassiale comincia a suddividersi in distinti aggregati di cellule chiamati somitomeri. La formazione dei somitomeri procede dal cranio verso la coda per poco più di dieci giorni dando origine a circa una cinquantina di somitomeri per ognuno dei due cordoni di mesoderma parassiale. All'inizio della 4ª settimana, ad eccezione dei primi 7 cefalici, i somitomeri iniziano a frammentarsi in blocchi di cellule chiamati somiti (Figg. 11-4 e 11-5).

I somiti si formano a coppie su entrambi i lati della linea mediana; il primo paio, i somiti occipitali, si forma subito dietro la fine dell'apice della notocorda e la loro formazione procede in direzione cranio-caudale. La lunghezza del **mesoderma pre-somitico** (in pratica il mesoderma parassiale) però non varia: infatti a mano a mano che l'estremità craniale del mesoderma presomitico si segmenta per formare nuovi somiti, altro mesoderma viene aggiunto per proliferazione all'estre-

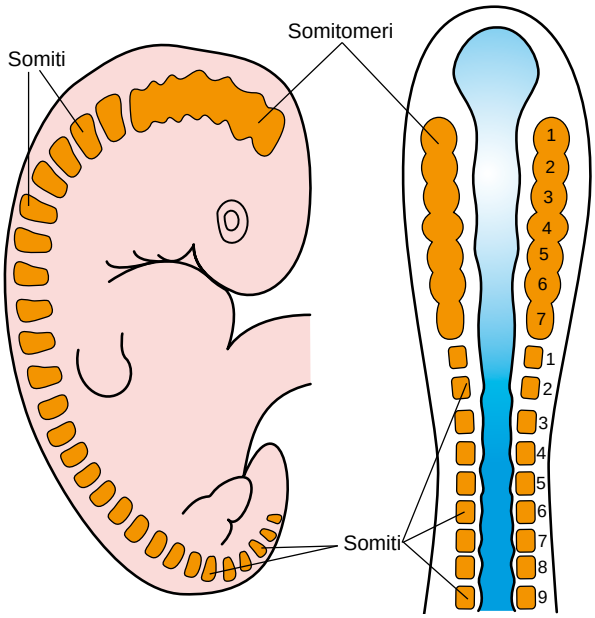



**Figura 11-4** ■ Derivati del mesoderma parassiale: somitomeri e somiti.

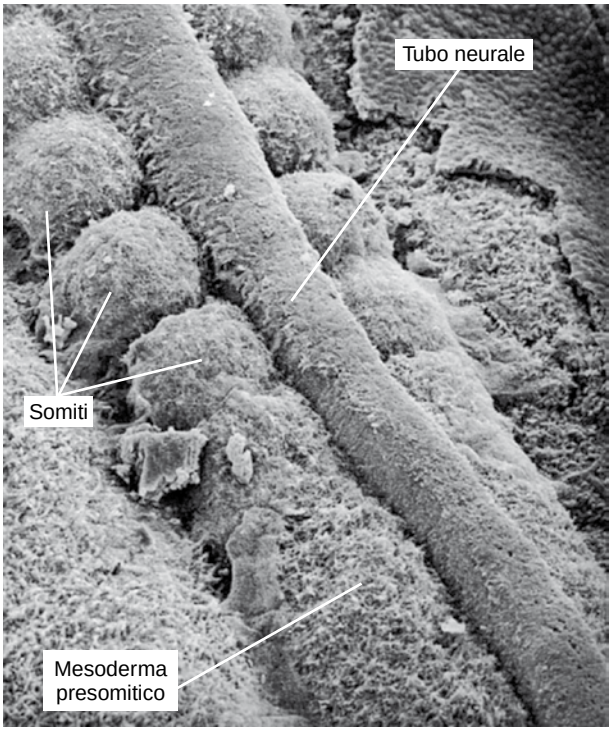



**Figura 11-5** ■ Fotografia al microscopio elettronico a scansione dei somiti che si formano dal mesoderma parassiale pre-somitico, ai lati del tubo neurale. (Per gentile concessione di Kathryn W. Tosney.)

mità caudale, mentre la regione caudale dell'embrione si allunga. Inizialmente i somiti sono dei blocchi sferici e solidi di mesoderma/mesenchima, ma presto a livello della loro superficie le cellule si organizzano in un monostrato epiteliale (**epitelializzazione dei somiti**, vedi più avanti) a seguito di una **transizione mesenchima-epitelio** (**MET**, mesenchymal epithelium transition) (Fig. 11-6). Al suo interno ogni somite forma una cavità, il **somitocele**, che contiene cellule con caratteristiche mesenchimali, le cellule del somitocele. Il numero delle paia di somiti e il tempo richiesto per ognuna di esse per formarsi è fisso e specie-specifico. Nell'uomo il primo paio di somiti si forma intorno al 20° giorno e poi si formano circa 3 paia di somiti al giorno, per cui alla fine della 5ª settimana si formano 42-44 paia di somiti, di cui però ne restano, in media, 37-38: 4 occipitali, di cui il primo scompare; 7 cervicali; 12 toracici; 5 lombari; 8-10 coccigei, di cui gli ultimi 5-7 scompaiono.

## Maturazione dei somiti

Ogni somite, una volta formato, va incontro allo stesso programma di sviluppo per formare tre gruppi distinti di cellule: lo **sclerotomo**, che darà origine alle vertebre e alle costole; il **miotomo**, che formerà la componente muscolare dello scheletro assile, della parete del corpo e degli arti; il **dermatomo**, che formerà il derma della cute del dorso (Fig. 11-6). Per formare lo sclerotomo le cellule della porzione ventro-mediale di ogni somite vanno incontro a una **transizione epitelio-mesenchima** (EMT, epithelium mesenchymal transition) e, insieme alle cellule del somitocele, migrano per circondare la notocorda e il tubo neurale; queste cellule si organizzano per formare le vertebre della colonna vertebrale e le costole della gabbia toracica (vedi Capitolo 18). La porzione dorsale del somite rimane invece epiteliale e forma il **dermamiotomo**. Dall'estremità dorso-mediale (dermamiotomo epiassiale ed epiassiale intermedio) e ventro-laterale (dermamiotomo ipoassiale) del dermamiotomo migrano cellule che si posizionano più in basso, formando il miotomo, uno strato che si interpone fra dermamiotomo e sclerotomo. Le cellule che migrano dalla porzione dorso-mediale del dermomiotomo daranno origine ai muscoli epiassiali (muscoli della colonna), mentre quelle che migrano dalla porzione ventro-laterale ai muscoli ipoassiali (parete del corpo e muscoli degli arti) (Fig. 11-6A). Le cellule del miotomo non proliferano attivamente, ma lo strato si accresce per continuo richiamo di nuove cellule dal dermamiotomo. Quando tutte le cellule del miotomo sono migrate, le cellule rimanenti diventano un tessuto mesenchimale e danno origine al dermatomo.

La maturazione dei somiti procede in direzione cranio-caudale, infatti i somiti anteriori si formano per primi e cominciano il programma di sviluppo prima di quelli posteriori (Fig. 11-6B). Nonostante ogni somite vada incontro allo stesso programma di sviluppo, la morfologia finale di ogni derivato (sclerotomo, miotomo, dermatomo) dipende dalla sua posizione lungo l'asse cranio-caudale: i derivati dei somiti si formano in modo identico, ma crescono secondo la posizione lungo l'asse, seguendo un'informazione posizionale già presente prima della segmentazione.

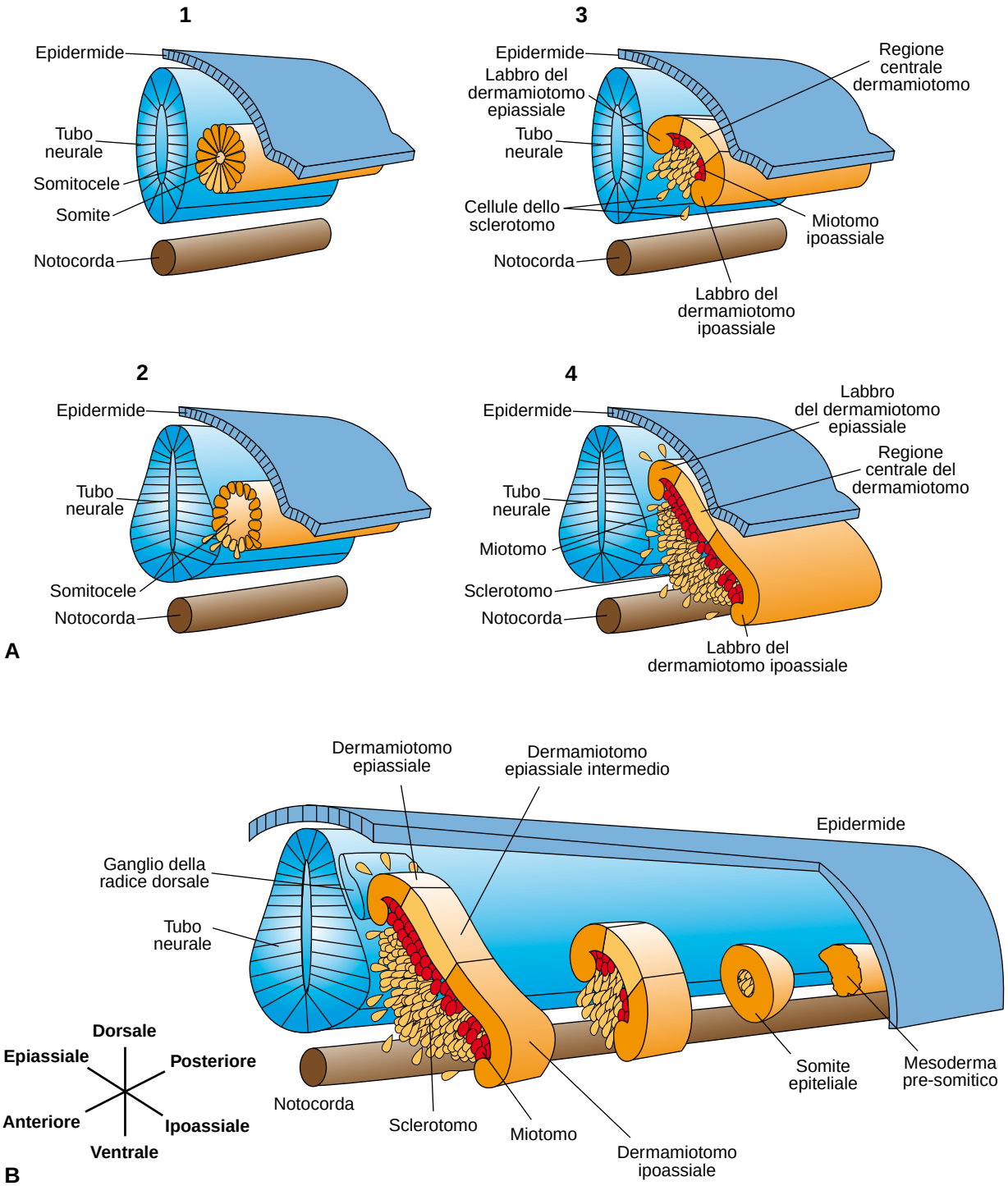



**Figura 11-6** ■ *A)* Stadi successivi dello sviluppo del somite. *B)* Differenziamento dei somiti lungo l'asse antero-posteriore.

## Il mesoderma intermedio

Il mesoderma intermedio si trova inizialmente in continuità con il mesoderma parassiale, dove già si stanno formando i primi somiti, separandolo da quello laterale (vedi più avanti). Durante la 4ª settimana, mentre si sviluppano i somiti, l'embrione acquista una forma cilindrica a causa del ripiegamento sul piano laterale. Come risultato i somiti si staccano definitivamente dal mesoderma intermedio. Successivamente verso la fine della 4ª settimana, il mesoderma intermedio si separa anche da quello laterale e forma due cordoni pari di cellule che decorrono dalla regione occipitale alla regione sacrale dell'embrione.

Dal mesoderma intermedio originano quasi tutti gli organi dell'apparato uro-genitale (vedi Capitolo 12). Durante questa settimana, la regione più craniale di ciascuno dei due cordoni del mesoderma intermedio dà origine ad un **pronefro**, che si segmenta in rudimentali nefroni (organi escretori forse funzionanti nel depurare il sangue dell'embrione). La porzione restante rimane inizialmente come cordone compatto e dà origine in sequenza al **mesonefro** e al **blastema metanefrico** o **metanefro**, le strutture da cui si formeranno il sistema urinario definitivo e nel maschio anche tratti delle vie genitali (vedi Capitolo 16).

## Il mesoderma laterale e il celoma embrionale

Abbiamo visto che il mesoderma laterale alla fine della 3ª settimana appare formato da due lamine: una dorsale, il **mesoderma somatico** o **somatopleura**, che è in continuità con la somatopleura extra-embrionale che riveste l'amnios, e una ventrale, il **mesoderma splancnico**, o **splancnopleura**, che è in continuità con la splancnopleura extra-embrionale del sacco vitellino (Fig. 11-7). Inizialmente le due lamine delimitano la cavità del celoma embrionale, che comunica con quella del celoma extra-embrionale, ma durante la 4ª settimana, in seguito ai ripiegamenti dell'embrione, i due celomi si separano. Il **celoma embrionale** formatesi già nel corso della 3ª settimana per confluenza di spazi tra la splancnopleura e la somatopleura ha una forma di un tubo ripiegato ad U (vedi Capitolo 10). La regione a forma di ferro di cavallo sita nella regione craniale dell'embrione posteriormente al setto trasverso e anteriormente alla membrana buccofaringea, diventerà la cavità pericardica, mentre le regioni laterali diventeranno le cavità pleuriche e pelvica-peritoneale rivestite da sottili membrane, le **sierose**.

Il rivestimento interno o **strato viscerale**, formato dalla splancnopleura, dà origine ai tessuti connettivi e muscolari lisci della parete degli organi viscerali nonché alle **sierose viscerali**, le sottili membrane che rivestono gli organi contenuti nelle cavità derivate dal celoma embrionale, le cavità pleuriche che contengono i polmoni, la cavità pelvica-peritoneale che contiene stomaco, intestino, fegato, pancreas e milza, e la cavità pericardica che contiene il cuore. Lembi delle sierose formano i mesenteri, gli omenti ed i legamenti che sostengono gli organi viscerali alla cavità pelvica-peritoneale (vedi Capitolo 15).

Il rivestimento esterno o **strato parietale**, formato dalla somatopleura, dà origine alle **sierose parietali** che, continuandosi con le sierose viscerali, rivestono le cavità derivate dal celoma intraembrionale sopra menzionate. Inoltre dallo strato parietale originano i tessuti connettivi che formano la parete di tali cavità e il derma delle regioni laterali e ventrale del corpo.

Dal mesoderma splancnico derivano anche le prime cellule del sangue, i vasi sanguigni, compreso il cuore, e i muscoli lisci dei visceri. Nella regione craniale l'area cardiogenica della splancnopleura, comprendente i tubi cardiaci e i vasi annessi, ruota di quasi 180° seguendo il ripiegamento longitudinale dell'embrione e trascinando l'abbozzo del cuore ventralmente (vedi paragrafo seguente). I tubi cardiaci si fondono e acquistano una parete muscolare che già all'inizio di questa settimana si contrae seppure in modo irregolare. Per la descrizione dello sviluppo del cuore e dei vasi si rimanda al Capitolo 17.

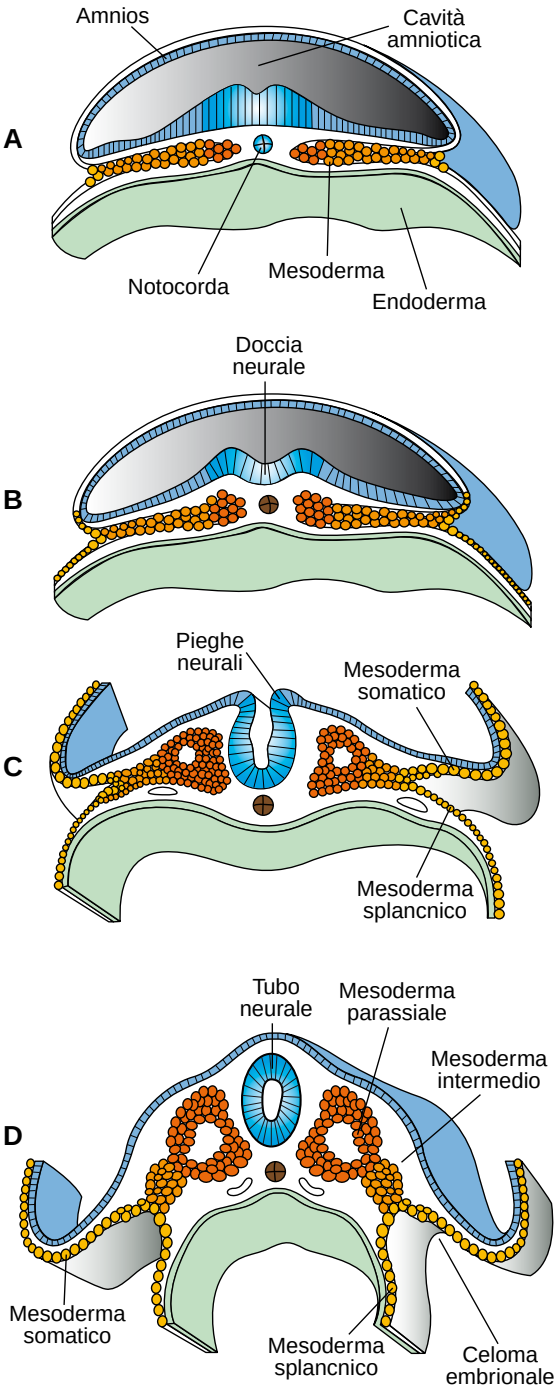



**Figura 11-7** ■ Schema dell'evoluzione del mesoderma.

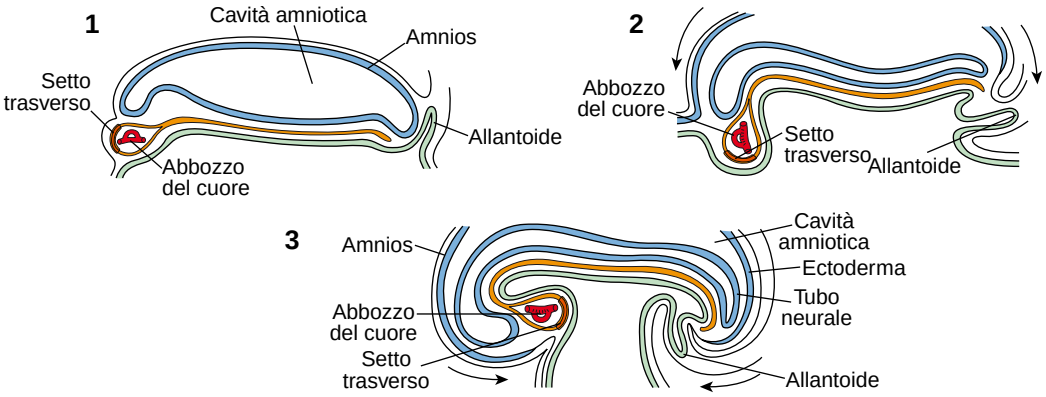



**Figura 11-8** ■ Schema dell'evoluzione dei ripiegamenti longitudinali.

VIDEO 4

## I RIPIEGAMENTI DELL'EMBRIONE

Come già accennato, durante la 4ª settimana avvengono i ripiegamenti dell'embrione che lo porteranno ad acquisire una forma cilindrica e ad essere rivestito completamente dall'amnios.

Tali avvolgimenti iniziano a posizionare gli abbozzi degli organi nel loro appropriato orientamento anatomico e forniscono un meccanismo per incorporare lo spazio con i tessuti per il successivo sviluppo delle cavità interne. Tale processo inserisce parte del sacco vitellino nel rivestimento interno dell'apparato digerente e porta alla formazione delle pareti del corpo e delle sue cavità interne. Come risultato, i ripiegamenti conferiscono all'embrione la forma di un cilindro e ne determinano la delimitazione rispetto agli annessi. Infatti, fino alla gastrulazione l'embrione è un disco in continuità con gli annessi per tutto il suo contorno. La delimitazione, che consiste in un fenomeno di avvolgimento, lo trasforma in un tubo e lo isola dai suoi annessi ai quali resta infine connesso solo mediante un sottile peduncolo, il **funicolo** o **cordone ombelicale**. Inoltre, da un punto di vista morfogenico, i ripiegamenti dell'embrione determinano lo sviluppo dell'endoderma in un tubo inizialmente rettilineo, l'**intestino primitivo** (vedi paragrafo successivo).

I ripiegamenti avvengono sui due piani dell'embrione: quello longitudinale e quello laterale.

### Il ripiegamento longitudinale e la delimitazione del corpo in senso longitudinale

Il ripiegamento longitudinale è il risultato dei ripiegamenti longitudinali a livello delle regioni della testa (**craniale**) e della coda (**caudale**). Considerando che il foglietto ectodermico è strettamente accollato a quello endodermico a livello della **membrana buccofaringea** e della **membrana cloacale**, la sua rapida crescita, dovuta allo sviluppo del cervello e del midollo spinale, rappresenta la causa principale di tali ripiegamenti. A ciò si aggiunge l'accrescimento della cavità amniotica in direzione longitudinale (Fig. 11-8).

I ripiegamenti longitudinali determinano:

- l'allineamento degli abbozzi degli organi lungo l'asse cefalo-caudale;
- la delimitazione del corpo in senso longitudinale.

#### Regione craniale

Nella regione craniale, il cervello anteriore si sviluppa crescendo dorsalmente all'interno della cavità amniotica, al di sopra della membrana faringea e si proietta oltre l'area cardiogenica. Come risultato, il setto trasverso, il cuore primitivo, il celoma pericardico e la membrana bucco-faringea si muovono ventralmente (Fig. 11-8) Parte del sacco vitellino viene incorporato nell'embrione, delimitando l'intestino anteriore, che anteriormente finisce cieco a livello della membrana bucco-faringea. Il setto trasverso si posiziona posteriormente al cuore, e formerà parte del diaframma. Al termine del ripiegamento si stabilisce quindi l'allineamento corretto degli organi sia lungo l'asse cefalo-caudale, che quello dorso-ventrale. Difatti il celoma pericardico si localizza ventralmente, mentre il canale pleuro-peritoneale, che mette inizialmente in comunicazione la cavità pericardica con quelle pleuriche e pelvica-peritoneale, decorre dorsalmente, sopra al setto trasverso. La cavità pelvica-peritoneale comunica ancora con il celoma extra-embrionale.

#### Regione caudale

Anche nella regione caudale il foglietto ectodermico si espande spinto dalla crescita rapida del midollo spinale. Tale crescita determina il ripiegamento della regione caudale in direzione ventrale, con l'incorporazione nel corpo dell'embrione di parte del sacco vitellino: comincia così a delimitarsi l'intestino posteriore. Al termine del ripiegamento la linea primitiva si trova posteriormente alla membrana cloacale, il peduncolo embrionale è attaccato alla superficie ventrale dell'embrione e l'allantoide viene parzialmente incorporato all'interno dell'embrione (Fig. 11-8).

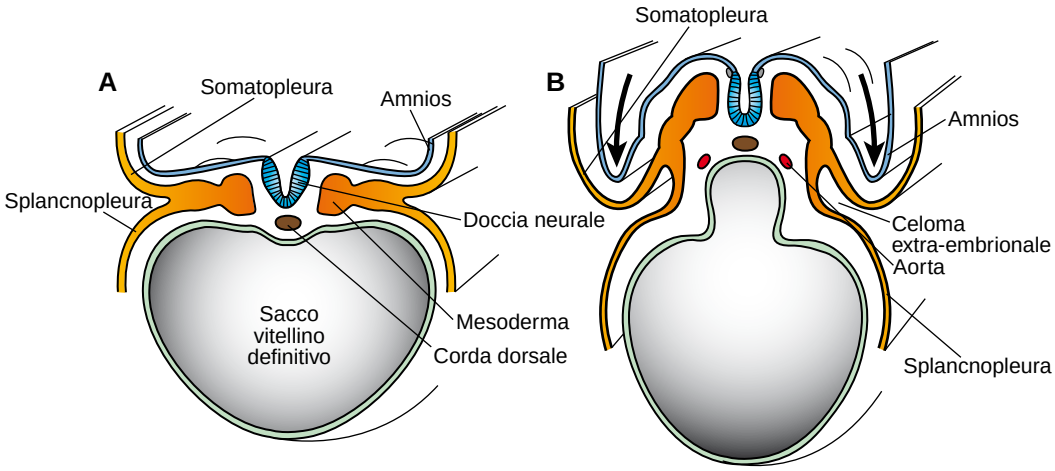



**Figura 11-9** ■ Schema dell'inizio del ripiegamento in senso trasversale.

## Il ripiegamento trasversale e la delimitazione delle pareti laterali e ventrali del corpo

La delimitazione in senso trasversale avviene per il ripiegamento della somatopleura verso il piano mediano dell'embrione in direzione ventrale, formandosi così un embrione cilindrico. Ciò è dovuto all'accrescimento del mesoderma parassiale e alla formazione dei somiti, ma soprattutto all'espansione contemporanea della cavità amniotica in direzione trasversale (Fig. 11-9). Il ripiegamento trasversale porta all'incorporazione di parte del sacco vitellino all'interno del corpo dell'embrione, e alla formazione di un tubo (inizialmente ampiamente comunicante con il sottostante sacco vitellino), l'intestino primitivo. L'avvolgimento della membrana amniotica intorno all'embrione porta a risultati differenti a seconda del livello in cui avviene lungo l'asse cefalo-caudale.

Nella **regione sopra-ombelicale** e in quella **sotto-ombelicale** l'avvolgimento è completo e le pieghe dell'amnios, destra e sinistra, si fondono portando alla formazione delle pareti laterali e ventrale di queste regioni (Fig. 11-10A,B).

A livello della **regione ombelicale**, invece, la chiusura ventrale resta incompleta perché le pareti laterali incontrano centralmente il sacco vitellino; pur comprimendolo da tutti i lati, non lo staccano dall'embrione, ma si arrestano delimitando a ridosso dell'embrione un **anello ombelicale**; fino alla nascita questa rimane la zona di passaggio dei costituenti del funicolo ombelicale (Fig. 11-10C).

La combinazione dei ripiegamenti longitudinali e della delimitazione laterale ha l'effetto di dividere il sacco vitellino in tre parti:

- una parte viene incorporata all'interno dell'embrione nell'**intestino primitivo**;
- una parte viene compressa in un canale molto stretto, il **dotto vitellino**;
- la terza parte viene incorporata nel funicolo ombelicale formando il sacco vitellino residuo.

Inoltre, come già descritto sopra, i fenomeni morfogenetici provocano la formazione di due depressioni dell'epiectoderma a forma di imbuto rispettivamente a livello cefalico e caudale: la depressione cefalica, lo **stomodeo**, che termina a fondo cieco con la **membrana faringea** e rappresenta la regione della futura cavità orale, e quella caudale, il **proctodeo**, che termina con la membrana cloacale e, per quanto riguarda l'intestino, darà origine al **canale anale**.

**TABELLA 11-1**
Quarta settimana: inizio dell'organogenesi nell'embrione

| |
|---|
| ■ **Tubo neurale:** la fusione delle pieghe si estende dalla regione del collo alla regione craniale e caudale, il neuroporo anteriore si chiude al 23°-25° giorno, il neuroporo posteriore si chiude al 25°-28° giorno; le cellule delle cresta neurale si formano lungo tutto il dorso del tubo. |
| ■ **Placodi:** formazione dei placodi ottici ed otici nell'ectoderma di rivestimento. |
| ■ **Somiti:** stanno per ultimare la loro formazione. |
| ■ **Pronefro** (segmentato), **mesonefro** (sviluppo del dotto mesonefrico o dotto di Wolff) e **metanefro** (continuo non segmentato). |
| ■ **Celoma embrionale:** interrompe la comunicazione con il celoma extraembrionale, inizia la sua suddivisone in tre cavità, pleurica, pericardica e peritoneale. |
| ■ **Tubo cardiaco:** formazione della parete mio-epicardica, gelatina cardiaca, allungamento e ripiegamento; **vasi** (vene cardinali, vitelline e ombelicali; I, II, III, IV archi aortici, aorta dorsale, arterie vitelline e ombelicali). |
| ■ **Intestino primitivo:** suddiviso in anteriore, medio e posteriore, abbozzo delle vie respiratorie. |
| ■ **Archi branchiali:** si formano i primi tre archi branchiali. |

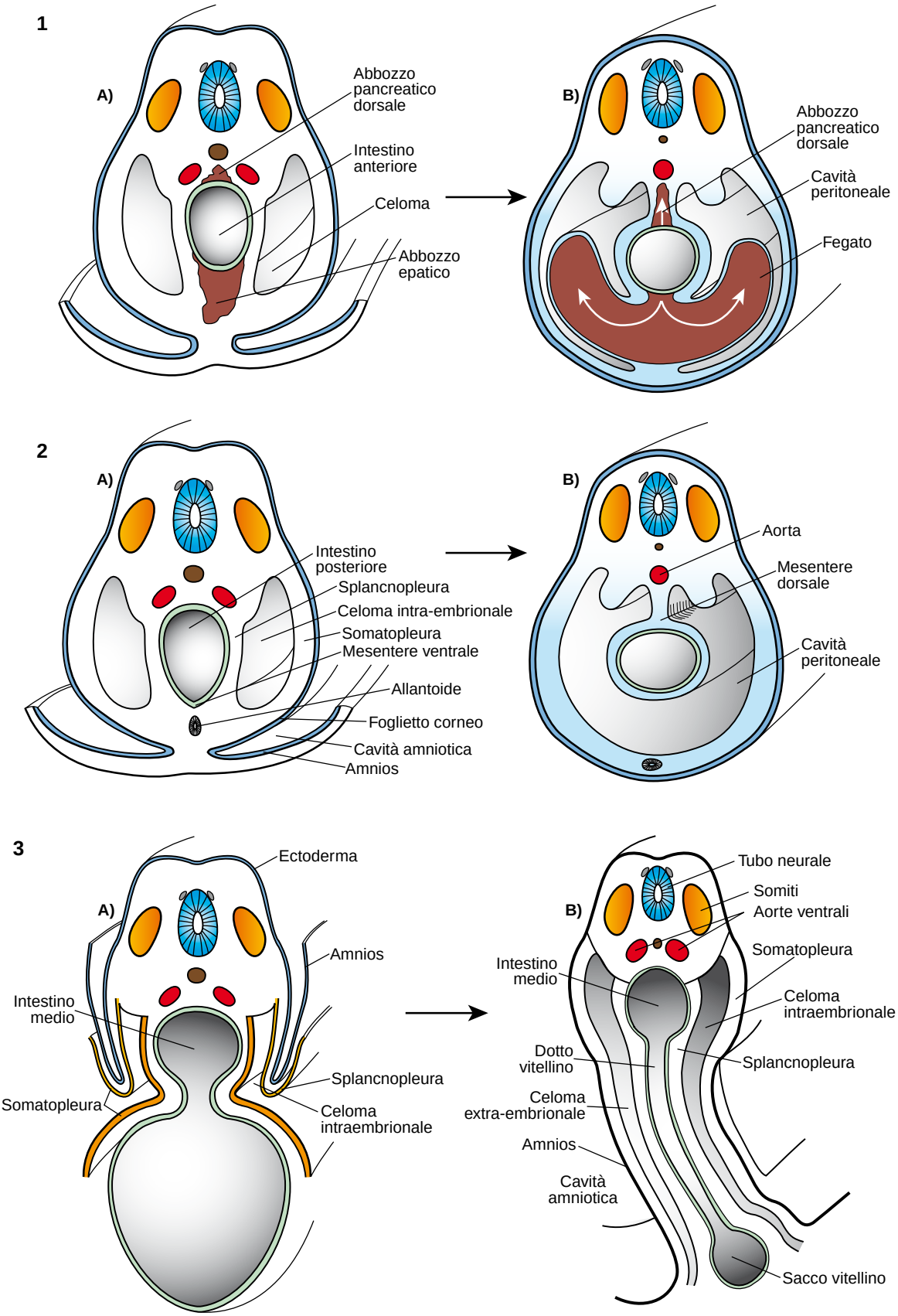



**FIGURA 11-10** ■ Schema dell'evoluzione dei ripiegamenti in senso trasversale nelle diverse regioni lungo l'asse antero-posteriore. *1)* regione sopra-ombelicale; *2)* regione sotto-ombelicale; *3)* regione ombelicale.

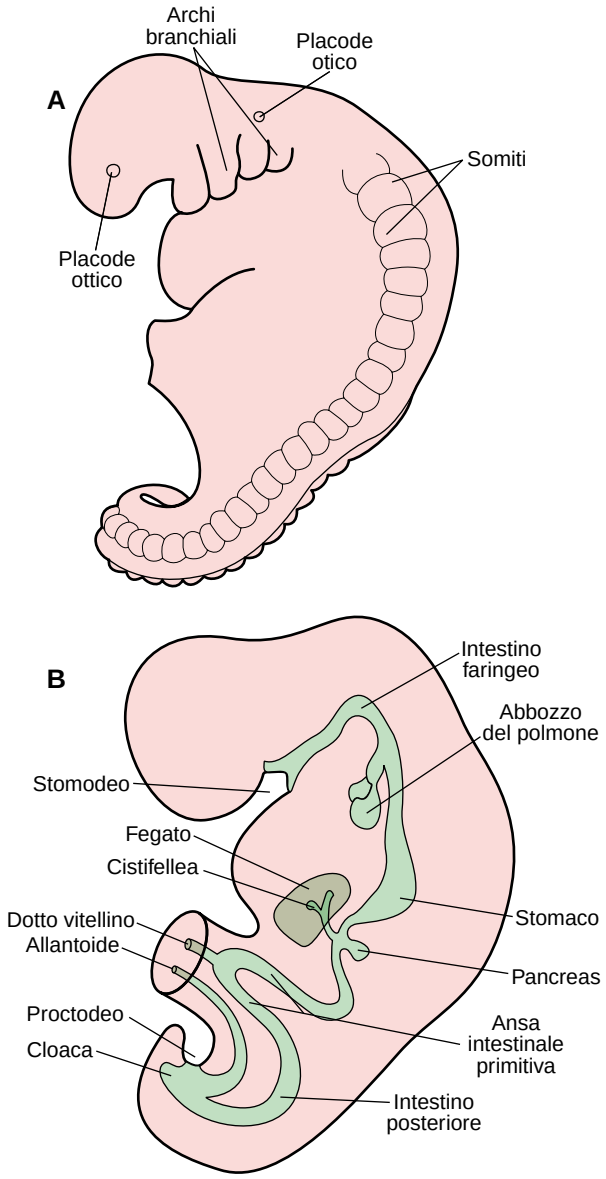



**Figura 11-11** ■ Schema raffigurante l'embrione umano alla fine della 4ª settimana. *A)* aspetto esterno; *B)* raffigurazione degli abbozzi dell'intestino primitivo.

## LO SVILUPPO DELL'ENDODERMA

Abbiamo visto che, come risultato dei ripiegamenti dell'embrione, il foglietto endodermico che rivestiva il tetto del sacco vitellino, si richiude su se stesso formando un tubo, l'**intestino primitivo** che racchiude parte del sacco vitellino. L'intestino primitivo decorre quindi lungo l'asse cefalo-caudale, dalla membrana buccofaringea a quella cloacale (Fig. 11-11).

I ripiegamenti combinati hanno l'effetto di dividere anche l'intestino primitivo in tre regioni distinte: la parte dove sbocca il **dotto vitellino** costituisce l'**intestino medio**. La parte che va dall'intestino medio alla membrana buccofaringea costituisce l'**intestino anteriore**, di cui la parte anteriore costituisce l'**intestino faringeo,** mentre quella che va dall'intestino medio alla membrana cloacale costituisce l'**intestino posteriore**, la cui regione terminale costituisce la **cloaca**.

Poco dopo la loro formazione, le tre parti dell'intestino vanno incontro ad attivi processi morfogenetici e organogenetici, che portano alla formazione, già alla fine della 4ª settimana dell'abbozzo delle vie respiratorie e di numerosi organi intestinali, in particolare del fegato e del pancreas (vedi Capitolo 15).

Dall'endoderma derivano quindi in direzione cefalocaudale, in parte o in tutto, i rivestimenti epiteliali di:

- tasche branchiali con i loro derivati (vedi Capitolo 14);
- sistema gastrointestinale e respiratorio (vedi Capitolo 15);
- vescica urinaria e uretra (vedi Capitolo 16).

La Figura 11-12 mostra i principali derivati dell'endoderma.

## GLI ANNESSI EMBRIONALI DURANTE LA 4ª SETTIMANA

Come discusso, i ripiegamenti delimitano il corpo dell'embrione separandolo dagli annessi embrionali. Durante questa settimana, l'amnios si sviluppa notevolmente ricoprendo tutto l'embrione fino all'anello ombelicale, da cui emergono il sacco vitellino e il peduncolo di connessione. L'embrione rivestito dall'amnios è contenuto in un'ampia cavità corionica (Fig. 11-13). Tra la 4ª e l'8ª settimana, l'aumento di produzione di liquido amniotico provoca un aumento considerevole del volume della cavità amniotica, che alla fine occuperà tutta la cavità corionica, di cui resteranno solo poche vescicole residue.

## PROCESSI E MOLECOLE

### *Lo schema corporeo lungo l'asse antero-posteriore: i geni Hox*

Abbiamo visto nel capitolo precedente che durante la gastrulazione due "centri di segnalazione", l'**AVE** e il **nodo primitivo**, collaborano per determinare le regioni della testa e della coda, definendo la polarità cefalocaudale dell'embrione. La **posizione degli organi**, lungo l'asse A-P (antero-posteriore), cioè dove fare gli occhi o le orecchie, dove le braccia o le gambe e così via, viene invece specificata dall'espressione dei **geni omeotici** o geni ***Hox*** (homeobox) nelle strutture in formazione. I geni *Hox* codificano per proteine con funzione di **fattori di trascrizione**, caratterizzate da sequenze identiche di aminoacidi, gli **omeodomìni**, in grado di legare specifiche sequenze di DNA e quindi attivare specifici gruppi di geni. Queste proteine attivano cascate di geni, la cui combinazione di espressione determinerà la composizione di ogni singolo segmento del corpo lungo l'asse A-P.

I geni *Hox* sono stati scoperti nel 1983 in Drosofila (moscerino dell'aceto) indipendentemente da Ernst Ha-

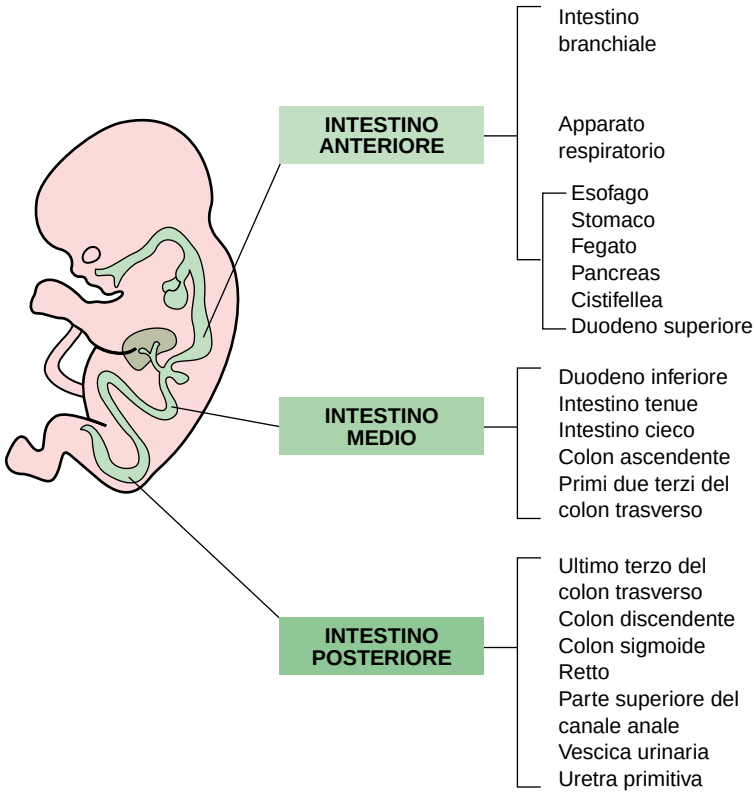



**FIGURA 11-12** ■ Principali derivati dell'endoderma.

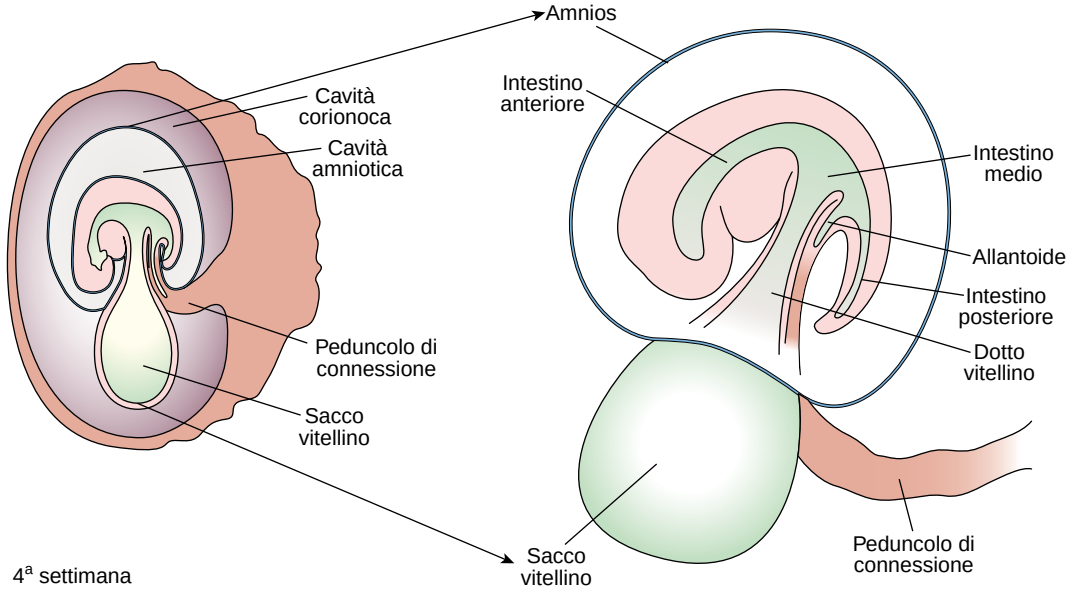



**FIGURA 11-13** ■ Evoluzione degli annessi embrionali.

fen, Michael Levine e William McGinnis nel laboratorio di Walter Jakob Gehring in Svizzera e da Matthew P. Scott e Amy J. Weiner, nel laboratorio di Thomas C. Kaufman negli Stati Uniti.

Questi ricercatori osservarono che mutazioni in alcuni geni causavano trasformazioni omeotiche, ovvero un posizionamento anomalo, mancanza o duplicazioni di strutture del corpo del moscerino. Ad esempio, nella

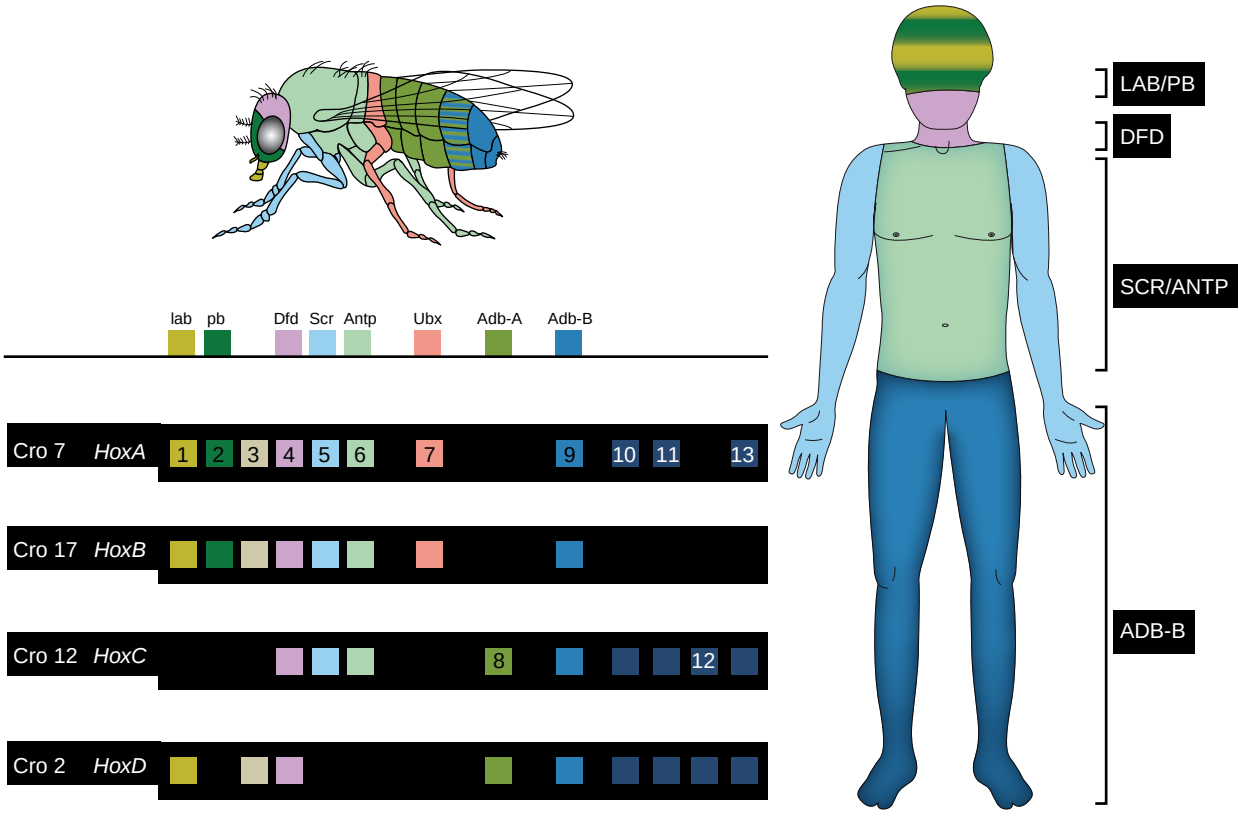



**Figura 11-14** ■ Schema dell'organizzazione dei geni *Hox* su un solo cromosoma in Drosofila e su quattro cromosomi nell'uomo.

mutazione *antennapedia*, un moscerino presentava zampe nella posizione dove normalmente ci sono le antenne. Si è poi visto che tali geni sono conservati fino all'uomo, anche se in maggior numero di copie. Sorprendentemente si è poi scoperto che gruppi di geni *Hox*, sono posizionati sullo stesso cromosoma in una sequenza da 3' a 5' che rispecchia la loro espressione lungo l'asse A-P. Il genoma del topo e quello dell'uomo contengono quattro gruppi di geni *Hox* per corredo aploide (in totale 38 geni *Hox* per corredo aploide), localizzati su quattro cromosomi diversi (da *Hoxa* a *Hoxd* nel topo e da *HOXA* a *HOXD* nell'uomo). I geni di mammifero *Hox/HOX* sono numerati da 1 a 13, a cominciare dall'estremità di ogni complesso che è espressa più anteriormente (Fig. 11-14). I geni con lo stesso numero, ma appartenenti a complessi diversi, vengono chiamati **paraloghi** (come *HOXA5, HOXB5* e *HOXC5* nell'uomo), essendo espressi a livello dello stesso segmento lungo l'asse. È sorprendente che, non solo lo stesso tipo di geni *Hox* si ritrovano negli insetti e nei mammiferi, ma anche l'ordine in cui tali geni sono posizionati sui rispettivi cromosomi è simile. Non è ancora del tutto chiaro come l'espressione di questi geni sia regolata nelle strutture in formazione. Sicuramente l'**acido retinoico** (**RA**), prodotto dal nodo di Hensen, gioca un ruolo importante regolando l'espressione dei geni *Hox* in maniera dose-dipendente: i geni posti al 3' risultano più sensibili all'azione di RA e per questo probabilmente vengono espressi prima. Lo schema di espressione dei geni *Hox* suggerisce che esiste un "codice", chiamato **codice dei geni *Hox***, attraverso cui la combinazione di geni *Hox* espressi specifica per le strutture di una particolare regione lungo l'asse A-P.

I meccanismi che determinano l'asimmetria laterale dello schema corporeo (destra/sinistra) e il ruolo delle ciglia primarie del nodo di Hensen in questo meccanismo sono descritti nel Capitolo 10.

## Mesoderma parassiale: i somiti e i loro derivati

Come abbiamo visto, i somiti si formano per segmentazione del mesoderma parassiale (chiamato anche **mesoderma pre-somitico**, **PSM**, nel pollo e **mesoderma non segmentato**, **USM**, nei mammiferi) in blocchi di cellule.

La formazione dei somiti presenta le seguenti caratteristiche: **periodicità**, **epitelializzazione**, **specificazione** e **differenziamento**.

### Periodicità

I somiti si formano a intervalli ciclici e regolari specie-specifici. Nell'uomo una nuova coppia di somiti si forma ogni 4-5 ore per circa due settimane (20°-35° giorno). Esperimenti nel pollo e nel topo hanno dimostrato che il

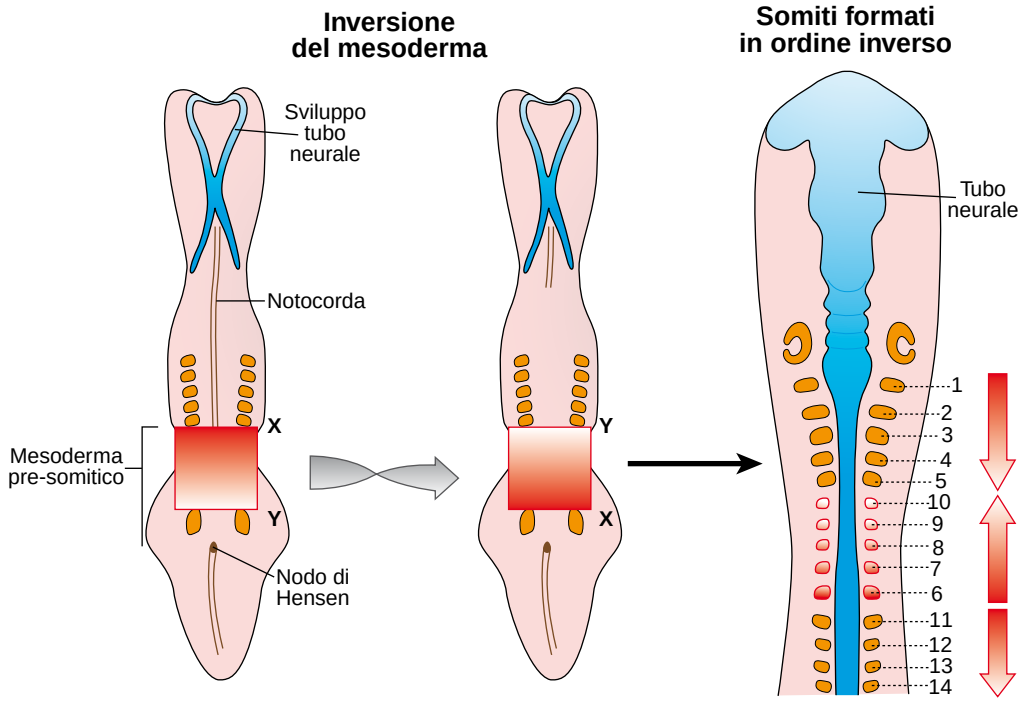



**FIGURA 11-15** ■ Esperimento di rotazione del PSM nell'embrione di pollo. La formazione dei somiti procede in direzione antero-posteriore. Se l'asse antero-posteriore del PSM viene ruotato di 180°, i somiti si formeranno secondo l'orientamento originale, come illustrato: il somite 6 si forma prima del 10, ma caudalmente ad esso.

mesoderma parassiale è già determinato a formare somiti in un dato tempo e in un dato luogo, indipendentemente dall'ambiente e dall'orientamento (Fig. 11-15). Tale capacità è acquisita probabilmente durante la gastrulazione a seguito di meccanismi non identificati e si basa su due meccanismi: un orologio molecolare interno e un gradiente di molecole segnale. Numerosi esperimenti hanno difatti permesso di chiarire che la periodicità temporale della formazione di ogni somite è regolata dall'espressione dei cosiddetti **geni oscillanti** e dai **gradienti di RA** e **FGF8/WNT3a** (modello "clock and wave front"). Ad oggi sono stati identificati numerosi geni oscillanti, per lo più codificanti proteine delle vie di segnalazione di **Notch** e di **WNT** (wingless and int). Le proteine oscillanti codificate da questi geni includono sia fattori di trascrizione come **HES7** (hairy and enhancer

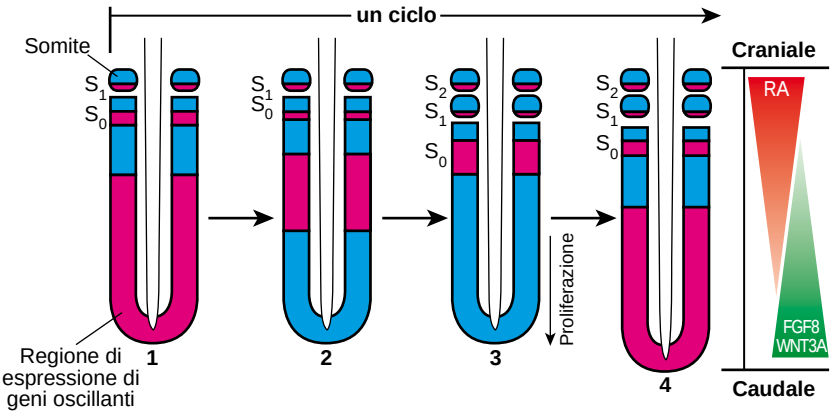



**FIGURA 11-16** ■ Espressione genica e vie di segnalazione nella somitogenesi. Schema illustrante l'onda di espressione ciclica dei geni oscillanti nei due cordoni di mesoderma parassiale. L'espressione di tali geni (in rosso) appare ciclicamente a livello delle cellule del mesoderma pre-somitico *(1)*, per poi restringersi nella porzione posteriore del somite che deve segmentare *(3)*, dopo di che riappare nelle cellule del mesoderma presomitico *(4)*. A destra è rappresentata la direzione dei gradienti di *FGF8* e WNT3A e quella in direzione opposta dell'acido retinoico (RA). $S_0$, somite in formazione; $S_1$ e $S_2$, somiti neoformati.

of split 7), **Nkd** (neurokinin receptor from Drosophila) della famiglia di Notch, e **Axin2** della famiglia di WNT, che enzimi, come **LFNG** (lunatic fringe) coinvolto nelle vie di segnalazione di Notch. Come indica il loro nome, l'espressione dei geni oscillanti appare ciclicamente, a intervalli di tempo definiti, a livello delle cellule del mesoderma pre-somitico. In particolare, seguendo l'espressione dei geni *Hes2* e *Lfng* nell'embrione di pollo si è osservato che essi sono espressi ciclicamente in un determinato momento in tutte le cellule della regione posteriore del PSM, per poi rimanere espressi solamente nella porzione posteriore dei somiti in formazione e del mesoderma che deve generare i somiti seguenti e riapparire successivamente nelle cellule del PSM posteriore (Fig. 11-16). Nella regione dove i nuovi somiti si staccano, le cellule mesenchimali vanno incontro a transizione mesenchima-epitelio (MET) attivata dalle proteine codificate da alcuni geni oscillanti che ne determina la separazione dal mesoderma (vedi paragrafo seguente). L'espressione di proteine chiamate **Efrine** e dei loro recettori, dalla cui interazione possono generarsi segnali di repulsione tra cellule, sulla membrana delle cellule della regione anteriore del somite in formazione e di quella posteriore del somite preesistente, favorisce il distacco del nuovo somite e determina la permanenza di uno spazio di separazione tra i somiti (Fig. 11-17).

Il segnale periodico generato dall'orologio molecolare a livello della regione dove si formano i nuovi somiti sembra essere controllato da un meccanismo spaziale che coinvolge gradienti di FGF8 e di WNT3A prodotti ad intervalli regolari nella regione caudale dell'embrione e di RA prodotto dai somiti neoformati nella regione craniale (Fig. 11-16). Si forma in questo modo un gradiente di RA in direzione cranio-caudale e uno di FGF8 e WNT3A in direzione caudo-craniale. La regione dove i due gradienti si incontrano corrisponde alla regione dove viene momentaneamente segregata e rimane attiva l'espressione dei geni oscillanti e dove si formerà una nuova coppia di somiti.

L'apposizione all'estremità caudale di nuove cellule mesenchimali derivate dalla proliferazione di cellule del mesoderma pre-somitico mentre il corpo dell'embrione si allunga, sposta caudalmente il fronte dei gradienti, predisponendo la formazione di una nuova coppia di somiti.

### *Epitelializzazione*

Svariati studi effettuati sul pollo hanno dimostrato che l'epitelializzazione dei somiti ovvero il passaggio da un'organizzazione cellulare mesenchimale ad una epiteliale, inizia prima che il somite si stacchi dal PSM. Tale processo è, per lo meno in parte, determinato dall'espressione di componenti della matrice extra-cellulare, come la **Fibronectina**, e di proteine adesive di membrana, quali la **N-caderina**, che consentono la produzione e l'organizzazione della lamina basale e la modulazione di giunzioni fra le cellule, inizialmente organizzate in una massa mesenchimale (Fig. 11-18). L'induzione di queste proteine sembra essere regolata dal fattore di trascrizione **paraxis**; quando l'espressione di paraxis viene inibita

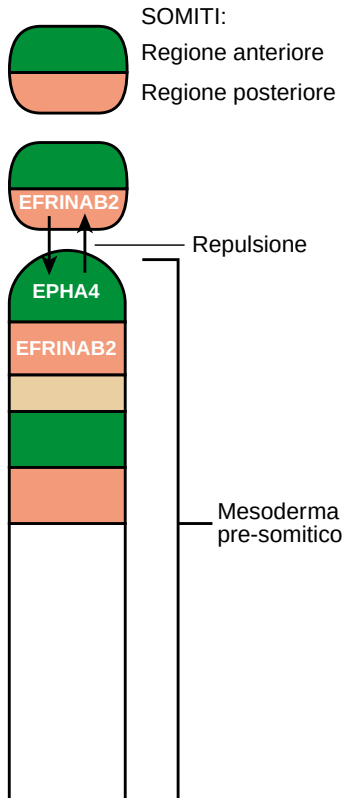



**Figura 11-17** ■ Modello per il distacco del somite. Il sistema efrine-recettore è in molti sistemi alla base della repulsione fra cellule. Nello Zebrafish si è visto che efrina B2 è espressa nelle cellule della porzione posteriore del somite in formazione (già al livello del PSM) mentre il suo recettore EPHA4 in quella anteriore. La repulsione fra le cellule esprimenti le due molecole facilita il distacco del somite dal PSM.

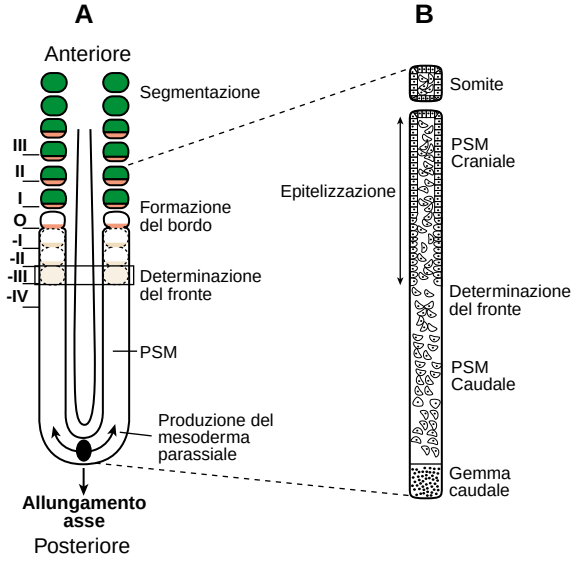



**Figura 11-18** ■ Schema illustrante i principali eventi della somitogenesi. I numeri romani negativi indicano i somiti di prossima formazione in direzione caudale.

sperimentalmente non si formano strutture epiteliali, dimostrando che questo fattore regola una parte essenziale della transizione da mesenchima a epitelio.

### Specificazione

Nonostante tutti i somiti appaiano inizialmente identici, formeranno poi strutture differenti in differenti posizioni lungo l'asse A-P. Tale specificazione è specificata molto precocemente a livello del mesoderma pre-somitico. Nel pollo è stato dimostrato che, se si isola da un embrione il mesoderma che darà origine ai somiti toracici destinati a formare le costole e lo si trapianta nella regione cervicale di un embrione più giovane, l'individuo ospite formerà costole nel collo (Fig. 11-19). Inoltre le costole si formano solo nel lato dove è stato trapiantato il mesoderma. Analogamente, l'inattivazione del gene *Hoxc-8* nel topo determina la formazione di vertebre toraciche in posizione lombare. Questo dimostra che i somiti sono specificati molto precocemente e, come discusso nel paragrafo precedente, in accordo con il codice *Hox* da loro espresso lungo l'asse A-P.

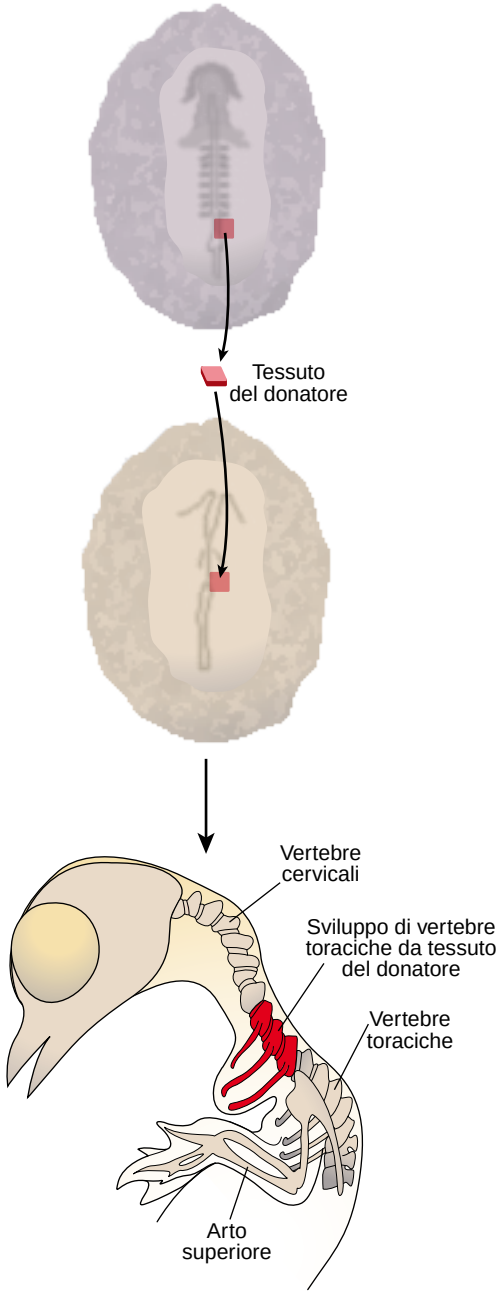



**Figura 11-19** ■ Specificazione del PSM nell'embrione di pollo. PSM a destino toracico, trapiantato nella regione cervicale di un altro embrione forma costole nel collo.

### Differenziamento

Sebbene il mesoderma sia specificato molto precocemente lungo l'asse A-P, la determinazione delle cellule all'interno di ogni somite verso un particolare destino differenziativo, avviene più tardi, quando il somite è già formato, ed è principalmente regolata da segnali locali. I tessuti vicini inducono infatti la diversificazione delle varie porzioni del somite. La combinazione dei segnali e la risposta delle varie porzioni del somite che oggi, in base a studi condotti nel topo, si pensa siano alla base del differenziamento delle diverse popolazioni di cellule del somite sono riassunte nello schema di Figura 11-20. In primo luogo, si verifica una transizione epitelio-mesenchima seguita da segnalazioni che inducono le cellule mesenchimali a differenziare in cellule dello sclerotomo, del miotomo o del dermatomo. In sintesi, segnali paracrini provenienti dalla notocorda e dalla regione ventrale del tubo neurale sembrano essere responsabili del destino delle cellule della porzione ventro-mediale del somite. La notocorda e il tubo neurale ventrale secernono **SHH** (sonic hedgehog) la cui azione induce, direttamente o indirettamente, l'espressione nelle cellule dello sclerotomo di **PAX1** (paired box 1), un fattore trascrizionale richiesto per il loro differenziamento in cellule della cartilagine e necessario per la formazione delle vertebre. La porzione del somite che rimane ancora epiteliale, il dermamiotomo, viene indotta a formare tre popolazioni cellulari distinte. Le cellule che si trovano nelle porzioni laterali e, in parte, mediale del somite sono cellule destinate alla miogenesi ovvero a formare muscolo scheletrico epiassiale o ipoassiale, mentre le rimanenti formeranno cellule del derma. Tale diversificazione di destino è determinata dai segnali provenienti dai tessuti vicini alle due porzioni. La miogenesi è un processo che prevede la determinazione delle cellule mesenchimali in mioblasti, che proliferano, per poi fuoriuscire dal ciclo cellulare, fondere fra loro per formare sincizi polinucleati e esprimere le proteine caratteristiche del tessuto muscolare (Fig. 11-21). Tutto ciò richiede l'attivazione dei cosiddetti geni regolatori della miogenesi, che includono ***MyoD*** (myogenic differentiation), ***Myf5*** (myogenic factor 5), **Miogenin**a e ***Mrf4*** (myogenic regulatory factor 4). Questi geni codificano per fattori di trascrizione della famiglia elica-ansa-elica, gli **MRF** (myogenic regulatory factors), che attivano la maggior parte dei promotori dei geni muscolo-specifici, inclusi quelli degli MRF stessi.

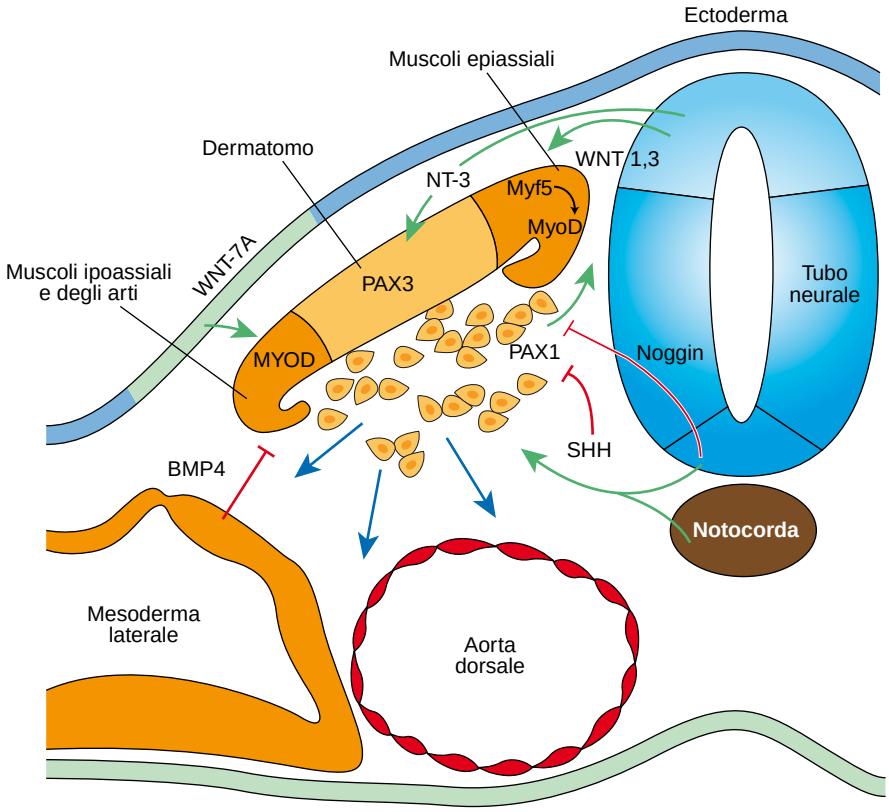



**Figura 11-20** ■ Modello di differenziamento del somite. La formazione dello sclerotomo nella porzione ventro-mediale del somite dipende dall'azione di SHH, prodotto dalla notocorda e dalla porzione ventrale del tubo neurale, che induce l'espressione di PAX1. Le cellule della porzione del dermamiotomo, che definiscono il dominio epiassiale, sono indirizzate al differenziamento miogenico dall'azione di WNT-1 e WNT-3, prodotti dalla porzione dorsale del tubo neurale, che inducono l'espressione di MYF5. MYF5 a sua volta attiva MYOD, la cui espressione è però attivata anche direttamente nelle cellule ventro-laterali da WNT-7A, prodotto dall'ectoderma dorsale, definendo il dominio ipoassiale. In aggiunta a questi segnali positivi, altri segnali inibitori, come noggin prodotto dalla porzione ventrale del tubo neurale, SHH prodotto dalla notocorda, e BMP4, prodotto dal mesoderma laterale, rifiniscono spazialmente la risposta delle cellule, prevenendo che un segnale agisca su un gruppo di cellule inappropriato. L'espressione di PAX3 nelle cellule della porzione dorso-laterale previene il differenziamento dei precursori miogenici, che migrano ai siti definitivi grazie all'espressione del recettore c-MET. La delaminazione del dermatomo dipende dall'azione di NT-3, prodotto dal tubo neurale.

Le cellule del somite, oltre a procedere verso il differenziamento miogenico devono aumentare di numero, per garantire la formazione della massa muscolare e devono collocarsi spazialmente nei siti definitivi. Lo studio su modelli di topo ha chiarito, in larga misura, la cascata di eventi e i bersagli molecolari necessari. Le cellule della porzione del dermamiotomo, che definiscono il dominio epiassiale, sono indirizzate al differenziamento miogenico dall'azione di **WNT-1** e **WNT-3**, prodotti dalla porzione dorsale del tubo neurale, che inducono l'espressione del gene *Myf5*. MYF5 a sua volta attiva *MyoD*. *MyoD* è attivato anche direttamente nelle cellule ventro-laterali da **WNT-7A**, prodotto dall'ectoderma dorsale, definendo il dominio del dermamiotomo ipoassiale. In seguito si avrà l'attivazione reciproca dei due fattori e quindi tutte le cellule co-esprimeranno MYF5 e MYOD. Le cellule rimaste ancora epiteliali nella regione dorso-mediale del somite, rispondendo a segnali provenienti dalla porzione dorsale del tubo neurale e dall'ectoderma dorsale, costituiscono il dermatomo, destinato a contribuire alla formazione del derma della pelle. In particolare, è stato dimostrato che la **Neurotrofina-3** (NT-3), prodotta dal tubo neurale, è necessaria per determinare il destino delle cellule di questa porzione. Per ulteriori dettagli su questi meccanismi si rimanda alla Figura 11-20.

### *Formazione dell'endoderma e specificazione iniziale dei suoi derivati*

Come già discusso nel Capitolo 10, l'espressione di **Nodal** a livello del nodo primitivo durante la gastrulazione è indispensabile per la formazione della linea primitiva e quindi dell'endoderma definitivo e del mesoderma. Evidenze sperimentali dimostrano inoltre che l'esposizione al segnale di Nodal, durante la migrazione dei progenitori endo-mesodermici lungo la linea primitiva, determina se il progenitore deve diventare

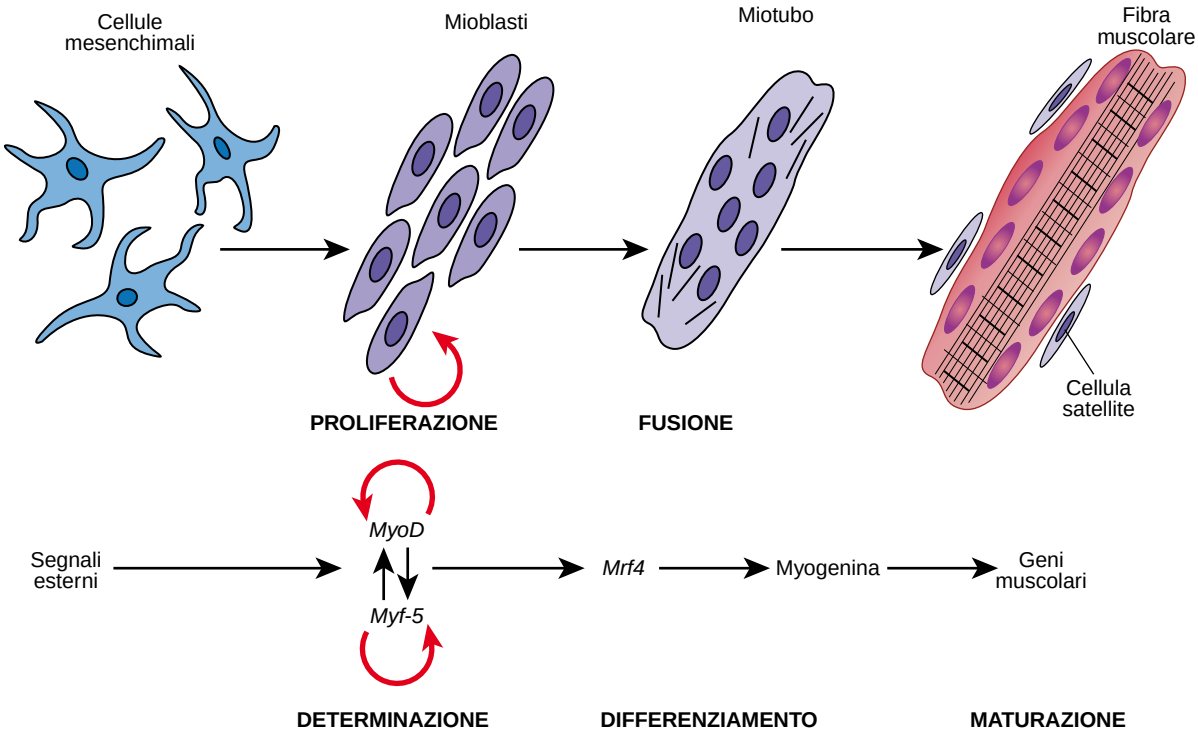



**Figura 11-21** ■ Modello della miogenesi in vivo. Segnali paracrini attivano l'espressione dei geni per i fattori trascrizionali MRF della determinazione miogenica, *MyoD* e *Myf5*, inducendo cellule mesenchimali a diventare mioblasti proliferanti. I geni *MyoD* e *Myf5* si attivano reciprocamente e attivano a loro volta l'espressione dei geni per i fattori MRF differenziativi, *Mrf4* e *Miogenina*, promuovendo la fuoriuscita dal ciclo, la fusione fra i mioblasti e l'espressione di geni per le proteine muscolari (proteine contrattili, enzimi muscolari e altre proteine). Le fibre nascenti vanno poi incontro a maturazione, processo per il quale è richiesto rimodellamento della matrice extracellulare e contatto con il nervo. Alcuni mioblasti non fondono e rimangono indifferenziati, quiescenti, a ridosso della fibra muscolare, per formare la riserva di cellule staminali del muscolo, le cellule satelliti. Le cellule satelliti potranno intraprendere il processo differenzativo, per garantire la crescita muscolare post-natale e il riparo in caso di danno. Gli MRF sono espressi esclusivamente in cellule muscolari e, se espressi forzatamente in cellule non muscolari, le convertono al fenotipo muscolare. Alla loro azione istruttiva contribuiscono comunque anche altri fattori, con cui gli MRF formano complessi trascrizionali, come membri della famiglia MEF2, non espressi esclusivamente nel muscolo.

endoderma o mesoderma. La concentrazione locale di Nodal sembra essere determinante in tale scelta: alti livelli di Nodal specificherebbero in senso endodermico, mentre livelli bassi in senso mesodermico. Il segnale di Nodal promuove l'attivazione di una complessa rete di fattori di trascrizione che non solo agirebbe per separare il destino mesodermico da quello endodermico, ma anche per dare identità regionale all'endoderma in formazione. Già alla fine della gastrulazione l'endoderma è infatti separato in regioni distinte, come dimostrato dall'espressione anteriore di fattori di trascrizioni come ***HHEX***, ***FOXA2*** and ***SOX2*** e posteriore di ***CDX1, 2, 3***.

Dopo l'induzione dell'iniziale definizione dello schema A-P avvenuta durante la gastrulazione, l'endoderma continua a ricevere segnali induttivi e di definizione delle sue varie regioni principalmente dal mesoderma, cosicché le regioni organo-formative lungo l'asse A-P sono definite dall'espressione di fattori specifici. I segnali che giocano un ruolo prevalente nella definizione della posizione degli organi endodermici lungo l'asse A-P includono membri delle famiglie dell'FGF, WNT, BMP e RA, la cui combinazione lungo l'asse determinerà l'espressione degli specifici fattori di trascrizione sopra riportati (Fig. 11-22). Per ulteriori informazioni sulla formazione di regioni e organi dell'endoderma si rimanda ai Capitoli 14 e 15.

## ASPETTI CLINICI

### *La madre*

Permangono l'amenorrea e i piccoli segni di gravidanza comparsi nella 3ª settimana (tensione e turgore dei seni, costipazione e pollachiuria (elevata frequenza di emissione di urina), nausea e vomito); le reazioni biologiche di gravidanza (livelli di hCG in crescita) diventano sempre più positive.

### *Malformazioni congenite vertebrali*

Per quel che riguarda anomalie nella formazione dei singoli organi e apparati si rimanda ai capitoli specifici. Citeremo in questa sede solamente le **malformazioni congenite vertebrali** (CVM) perché più direttamente le-

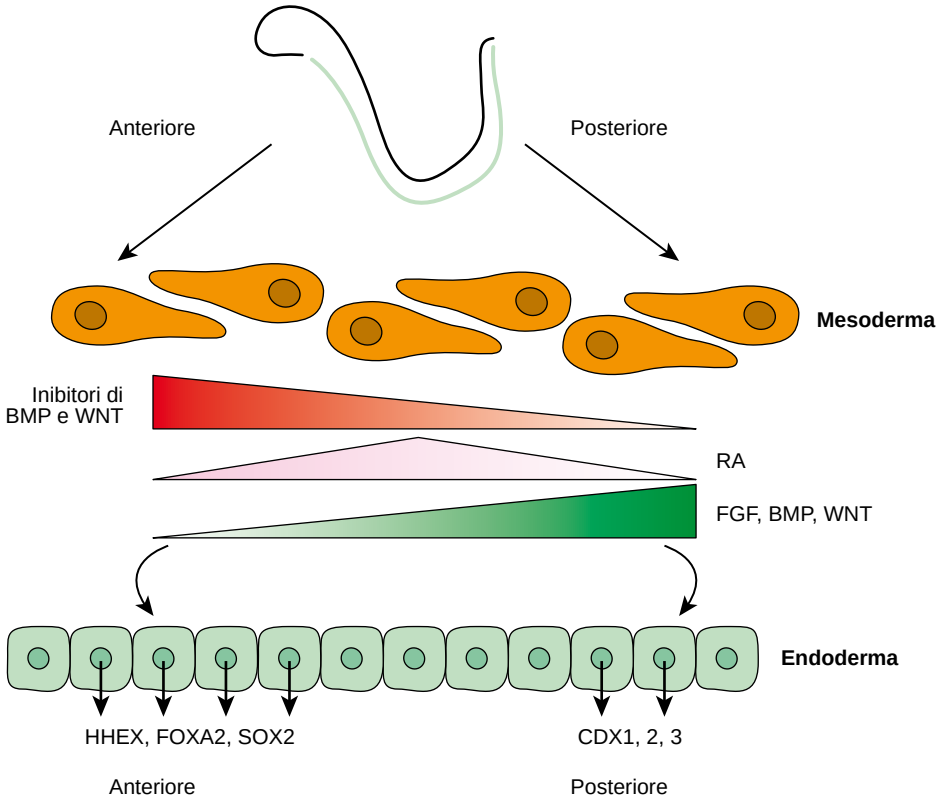



**Figura 11-22** ■ Segnali operanti nella definizione dello schema lungo l'asse A-P dell'endoderma in formazione. Le differenti regioni del mesoderma secernono fattori di crescita come FGF, BMP e WNT o loro inibitori che sulla base dei loro gradienti di concentrazione guidano il differenziamento dell'endoderma inducendo l'espressione di specifici fattori di trascrizione quali HHEX, FOXA2 and SOX2 e posteriore di CDX 1, 2, 3; anche l'acido retinoico (RA) partecipa alla segnalazione.

**Figura 11-23** ■ Microsomia emifacciale.

gate a difetti nella formazione e differenziamento dei somiti. Queste includono: la **microsomia emifacciale**, la **sindrome di Alagille**, la **disostosi spondilo-toracica**, quella di **Jarcho-Levin** e quella **spondilo-costale** (Fig. 11-23). Nell'insieme queste costituiscono un gruppo eterogeneo di malattie rare caratterizzate da malformazioni multiple vertebrali e costali (emivertebre, vertebre sopranumerarie, vertebre a farfalla, e altri tipi). Nell'ultimo decennio sono stati descritti diversi casi di pazienti affetti da tali patologie. I modelli di trasmissione ereditaria e le percentuali di sopravvivenza variano a seconda del sottotipo. Lo studio su modelli animali ha consentito di attribuire un contributo genetico alla patogenesi delle CVM, confermata poi da studi su pazienti umani. Mutazioni in geni della via di segnalazione di Notch (*Dll3*, *Mesp2* e *Lfng*), sono state infatti riscontrate in pazienti affetti da disostosi spondilo-costale. Il fenotipo dei pazienti umani appare del tutto simile a quello di modelli murini in cui geni per membri di tale via sono stati deleti. Anche per quel che riguarda la sindrome di Alagille, il 70% dei pazienti affetti presentano mutazioni nel gene *Jag1*, un ligando di Notch. Tutto ciò indica che tali patologie siano causate da difetti dell'orologio interno della segmentazione dei somiti.

Malformazioni vertebrali sono state anche riscontrate per cause teratogene. Ad esempio, in associazione con l'uso di alcool, di farmaci anticonvulsivi come l'acido valproico e la dilantina, con l'ipertermia e con diabete mellito materno. Meccanismi eziologici simili potrebbero essere coinvolti nello sviluppo di queste malformazioni.

## Letture consigliate


Aulehla A, Pourquié O. Non periodicity and directionality of somitogenesis. Anat Embryol 211 (Suppl 1), S3-S8, 2006.

Aulehla A, Pourquié O. Oscillating signaling pathways during embryonic development. Current Opinion in Cell Biology 20, 632-637, 2008.

Berrocal T, Gamo E, Navalon J, Prieto C, Al-Assir I, Cortes P, Pastor I, Hierro L. Syndrome of Alagille: radiological and sonographic findings. Eur Radiol 7, 115-118, 1997.

Borello U, Berarducci B, Murphy P, Bajard L, Buffa V, Piccolo S, Buckingham M, Cossu G. The Wnt/beta-catenin pathway regulates Gli-mediated Myf5 expression during somitogenesis. Development 133, 3723-3732, 2006.

Borello U, Buffa V, Sonnino C, Melchionna R, Vivarelli E, Cossu G. Differential expression of the Wnt putative receptors frizzled during mouse somitogenesis. Mech Dev 89, 173-177, 1999.

Brent AE, Tabin CJ. Developmental regulation of somite derivatives: muscle, cartilage and tendon. Current Opinion in Genetics & Development 12, 548-557, 2002.

Buckingham M. Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates. Current Opinion in Genetics & Development 16, 525-532, 2006.

Cossu G, Borello U. Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals. EMBO J 18, 6867-6872, 1999.

Cossu G, De Angelis L, Borello U, Berarducci B, Buffa V, Sonnino C, Coletta M, Vivarelli E, Bouche M, Lattanzi L, Tosoni D, Di Donna S, Berghella L, Salvatori G, Murphy P, Cusella-De Angelis MG, Molinaro M. Determination, diversification and multipotency of mammalian myogenic cells. Int J Dev Biol 44, 699-706, 2000.

Dequéant M-L, Glynn E, Gaudenz K, Wahl M, Chen J, Mushegian A, Pourquié O. A complex oscillating network of signaling genes underlies the mouse segmentation clock. Science 314, 5805, 1595-1598, 2006.

Giampietro PF, Dunwoodie SL, Kusumi K, Pourquie O, Tassy O, Offiah AC, Cornier AS,. Alman BA,. Blank RD, Raggio CL, Glurich I, e. Turnpenny PD. Progress in the understanding of the genetic etiology of vertebral segmentation disorders in humans. Ann NY Acad Sci 1151, 38-67, 2009.

Gilbert SF. Developmental Biology. 8a ed., Sinauer Associates, 2006.

Gridley T. The long and short of it: somite formation in mice. Dev Dynamics 235, 2330-2336, 2006.

Kanzel B, Foreman RK, Lbosky PA, Mllo M. BMP signalling is essential for development of skeletogenic and neurogenic cranial neural crest. Development 127, 1095, 2000.

McGinnis W, Krumlauf R. Hoeobox genes and axial patterning. Cell 68, 283, 1992.

Sasai Y, DeRobertis EM. Ectodermal patterning in vertebrate embryos. Dev Biol 182; 5, 1997.

Spence JR, Lauf R, Shroyer NF. Vertebrate intestinal endoderm development. Dev Dyn 240, 501-520, 2011.

Tajbakhsh S, Borello U, Vivarelli E, Kelly R, Papkoff J, Duprez D, Buckingham M, Cossu G. Differential activation of Myf5 and MyoD by different Wnts in explants of mouse paraxial mesoderm and the later activation of myogenesis in the absence of Myf5. Development 125, 4155-4162, 1998.

Tajbakhsh S, Rocancourt D, Cossu G, Buckingham M. Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD. Cell 89, 127-138, 1997.

# PARTE TERZA

12

# L'apparato tegumentario

Antonietta Salustri

L'apparato tegumentario costituisce il rivestimento esterno del corpo. Più comunemente noto come **pelle** o **cute**, è formato da un epitelio o **epidermide** e dal connettivo denso sottostante o **derma**. Al disotto del derma si trova un connettivo più lasso, l'**ipoderma**, che in diverse regioni del corpo si riempie di adipociti formando il **pannicolo adiposo**.

L'epidermide è costituita da diversi strati di **cheratinociti** in fasi differenziative via via più avanzate a partire dallo strato basale o germinativo verso la superficie libera, e in minor quantità da altre cellule, quali le cellule pigmentarie della pelle o **melanociti**, cellule di difesa immunitaria o **cellule di Langerhans** e cellule sensoriali o **cellule di Merkel**. All'epidermide sono anche annesse strutture specializzate dette annessi cutanei, cioè i **peli**, le **unghie**, i **denti** e diverse **ghiandole esocrine: sebacee**, **sudoripare** e **mammarie**. La pelle svolge funzione di protezione dell'organismo da traumi, raggi ultravioletti e batteri, ed inoltre di secrezione, escrezione e termoregolazione attraverso le ghiandole esocrine annesse.

## SVILUPPO DELL'EPIDERMIDE

Dopo la chiusura del tubo neurale, l'intera superficie dell'embrione è rivestita da un sottile strato di cellule dell'**ectoderma** o **epiectoderma** (Fig. 12-1A). Durante il 2° mese di sviluppo, queste cellule proliferano dando origine ad uno strato superficiale, che prende il nome di **periderma**, ed ad uno strato più profondo detto **strato basale** (Fig. 12-1B). Il periderma non partecipa alla formazione dell'epidermide definitiva, ma costituisce un rivestimento temporaneo dell'embrione. La presenza di giunzioni occludenti e di numerosi microvilli e vescicole nelle cellule del periderma fa ritenere che questo rivestimento funzioni da barriera e da regolatore degli scambi con il liquido amniotico fintanto che non sia formata l'epidermide. Infatti, durante il 3° mese (8-11 settimane), lo strato basale dà origine ad un nuovo strato, lo **strato intermedio**, le cui cellule iniziano a differenziare in **cheratinociti** (Fig. 12-1C). Non appena le cellule passano dallo strato basale a quello intermedio, cessano di proliferare e passano dall'espressione di cheratine Ktr5 e Ktr14 a

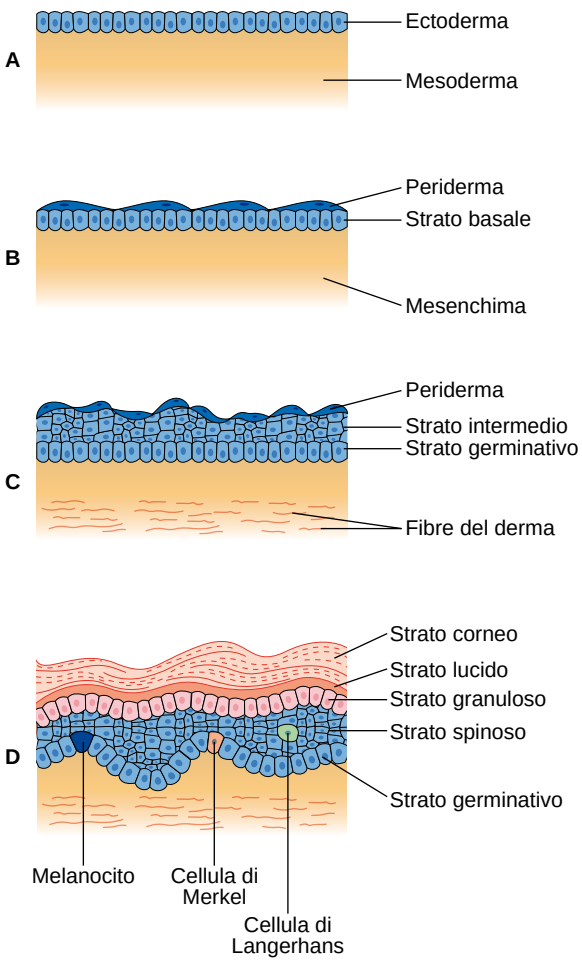



**Figura 12-1** Stadi successivi dello sviluppo della epidermide. *A)* 4 settimane; *B)* 7 settimane; *C)* 11 settimane; *D)* 24 settimane.

quella di Krt1 e Krt10, tipiche degli epiteli stratificati cheratinizzati. Inoltre aumenta l'espressione di proteine coinvolte nella formazione di adesioni cellulari, quali i desmosomi. Tra il 4° e il 6° mese (16-24 settimane) il numero degli strati cellulari aumenta progressivamente per la continua proliferazione delle cellule dello strato basale, ora detto **strato germinativo.** Durante la stratificazione vengono progressivamente sintetizzate le molecole responsabili dell'aggregazione dei filamenti di cheratina e della formazione dell'involucro corneificato, tra i quali la filaggrina, l'involucrina (15 settimane) e la loricrina (21 settimane). Così, alla fine della 24ª settimana sono ben riconoscibili nella maggior parte delle regioni del corpo, al di sopra dello strato germinativo, i tre strati definitivi dell'epidermide: lo **strato spinoso**, lo **strato granuloso** e lo **strato corneo** (Fig. 12-1D). È allora che il rivestimento superficiale del periderma viene perso. La desquamazione di queste cellule e successivamente dei cheratinociti corneificati insieme ai lipidi rilasciati dalle ghiandole sebacee formano la **vernice caseosa**, che probabilmente serve a proteggere la pelle continuamente esposta al liquido amniotico. Le cellule staminali dei cheratinociti permangono dopo la nascita nello strato germinativo e sono responsabili dell'omeostasi dell'epidermide. Queste cellule rappresentano una piccola frazione dei cheratinociti basali e attraverso una divisione cellulare asimmetrica danno origine a due cellule diverse, ovvero ad una cellula staminale e ad una cellula staminale progenitrice transiente, che si divide più volte prima di differenziare (transient-amplifying cells, vedi Capitolo 4).

All'incirca nella 6ª settimana, alcune cellule delle **creste neurali** migrano nell'epidermide in via di sviluppo e differenziano in **melanoblasti**, i precursori dei **melanociti**, le cellule pigmentate che nell'adulto costituiscono il 5-10% delle cellule dell'epidermide. I primi melanociti maturi sono identificabili per morfologia e caratteristiche istochimiche soltanto a partire dalla 10ª settimana e la pigmentazione in queste cellule non si verifica prima dei 4-6 mesi anche nei feti di pelle nera.

Le **cellule di Merkel** sono le cellule meccano-recettrici della pelle eccitabili al tatto e compaiono nell'epidermide tra il secondo e il terzo mese di sviluppo. L'espressione di diverse cheratine e, allo stesso tempo, di neuropeptidi e di numerose proteine neuronali ha portato a discutere a lungo se queste cellule originassero da cellule delle creste neurali o dalle **cellule staminali dell'epidermide**. Tuttavia, studi più recenti favoriscono la seconda ipotesi (vedi paragrafo "Processi e molecole").

Le **cellule di Langerhans** ammontano al 2-8% delle cellule dell'epidermide e sono cellule immunitarie della pelle che limitano la penetrazione di microrganismi mediante la presentazione dell'antigene e l'innesco della risposta cellulo-mediata. I precursori di queste cellule derivano dal midollo osseo, invadono l'epidermide durante il secondo mese (7 settimane), e differenziano in cellule di Langerhans mature a circa metà del quarto mese (14 settimane). Il numero delle cellule di Langerhans si mantiene relativamente basso fino a 6 mesi per poi aumentare fino alla nascita.

## SVILUPPO DEL DERMA

Il **derma**, il tessuto connettivo posto al di sotto dell'epidermide, ha un'origine diversa a seconda dell'area corporea: quello posto sul dorso del tronco deriva per la maggior parte dal **dermatomo** dei somiti per azione induttiva dell'ectoderma sul dermamiotomo, mentre quello laterale e ventrale del tronco e quello degli arti deriva prevalentemente dal **mesoderma laterale somatico**. Inoltre, il derma della faccia, della maggior parte del cranio e della parte anteriore del collo deriva in larga parte dalle cellule delle creste neurali che migrano dalla posizione più cefalica. Queste componenti embrionali inizialmente formano un **tessuto mesenchimale**, costituito da cellule immerse in una matrice extracellulare ricca in acido ialuronico. All'inizio del terzo mese le cellule mesenchimali differenziano in **fibroblasti** che iniziano a produrre una matrice intercellulare prevalentemente fibrosa. Il differenziamento viene completato durante il terzo trimestre, ma il derma continua ad ispessirsi attraverso tutta l'infanzia e l'adolescenza. La proliferazione del derma provoca la sua protrusione nella soprastante epidermide dando così origine alla **papille dermiche**. A loro volta le cellule dell'epidermide si estendono nel derma in via di sviluppo formando le **creste epidermiche**. Questa inter-digitazione provoca la comparsa sulla superficie cutanea di rilievi e di solchi che formano, tra la 10 e la 19 settimana, motivi specifici e diversi in differenti parti del corpo, per esempio anse e spirali sul palmo delle mani e sulla pianta dei piedi e una struttura simile ad una tela di ragno sul tronco. Il disegno cutaneo stabilito nel periodo fetale, rimane invariato per tutta la vita postnatale ed è specifico per ogni individuo, e perciò utilizzato per esaminare le impronte digitali sia in ambito legale che medico. Durante il 2° mese il derma diviene ampiamente vascolarizzato e subito dopo invaso da terminazioni nervose sensitive che raggiungono l'epidermide.

## SVILUPPO DEI DERIVATI DELLA PELLE

Tutte le strutture specializzate associate alla pelle, quali peli, denti e ghiandole, originano dall'ectoderma per induzione dal mesenchima sottostante seguita da una complessa reciproca interazione. In tutti i casi la fase iniziale è caratterizzata dalla formazione di un **placode**, cioè un ispessimento dell'epitelio, seguito da un addensamento del mesenchima associato. Poco dopo le cellule del placode iniziano a proliferare e formano una gemma epiteliale che si allunga nel mesenchima. La decisione della gemma di dare origine ad un capello o ad una ghiandola dipende dall'azione induttiva del mesenchima sottostante, il quale si pensa acquisisca caratteristiche specifiche regionali di cui mantiene memoria anche nella vita adulta. Infatti, l'ectoderma di una data regione del corpo trapiantato in un'altra tende ad assumere le caratteristiche regionali del derma sottostante piuttosto che quelle del suo sito di origine. In questo capitolo tratteremo più nello specifico lo sviluppo dei peli e delle ghiandole, mentre si rimanda al Capitolo 14 per lo sviluppo dei denti.

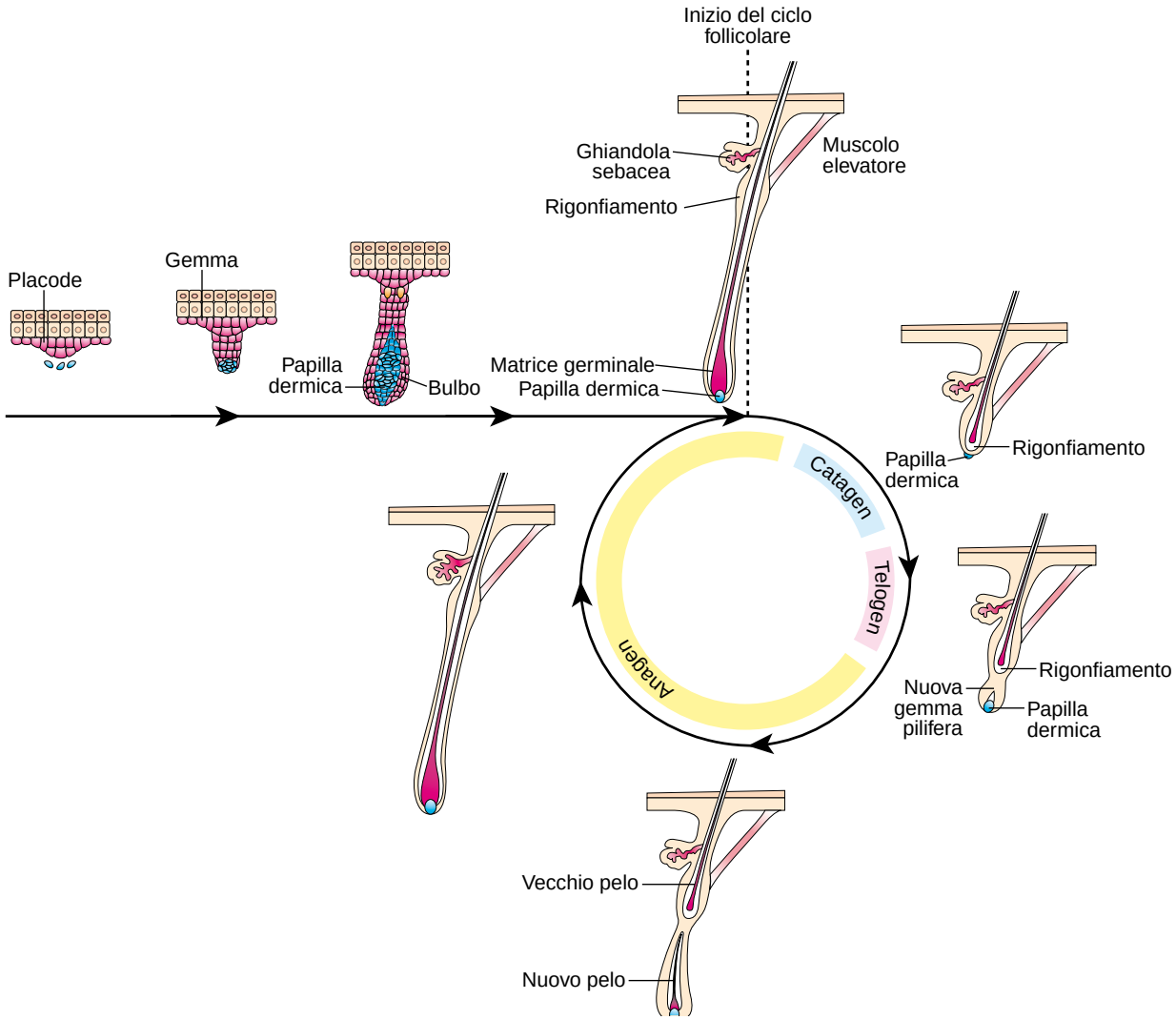



**Figura 12-2** ■ Stadi successivi della neogenesi dei peli durante l'embriogenesi e la loro rigenerazione ciclica nella vita postnatale.

## Sviluppo dei peli

I primi follicoli piliferi compaiono nel 3° mese al livello delle palpebre, delle sopracciglia e del labbro superiore. Raggiunto il 5° mese di sviluppo, le **gemme pilifere** sono presenti in tutte le regioni del corpo e continueranno ad aumentare fino alla fine della gravidanza. Il numero dei follicoli piliferi alla nascita è geneticamente determinato e non se ne formeranno altri nella vita postnatale. Sotto l'azione del mesenchima le cellule ectodermiche della gemma pilifera proliferano e si approfondano nel derma per formare l'**asse del pelo**. Successivamente, l'asse espande alla base formando il **bulbo**, e il derma si invagina in esso, formando la **papilla dermica** (Fig. 12-2). Lo strato di cellule ectodermiche a contatto con la papilla dermica, la **matrice germinale**, continua a proliferare dando origine alle cellule che andranno incontro ad un processo speciale di cheratinizzazione formando il **fusto** del pelo che si allunga dalla base verso la superficie attraversando il canale follicolare. L'eruzione dei peli sulla superficie corporea ha un andamento cefalo-caudale, infatti i primi a comparire sono le sopracciglia, verso la 16ª settimana, seguiti due settimane dopo dalla peluria del cranio. A circa sette mesi il corpo è ricoperto da una peluria bianca molto sottile detta **lanugo**, che viene sostituita poco prima della nascita da peli più spessi e pigmentati per l'infiltrazione di melanociti nel bulbo pilifero.

I peli sono strutture che ciclicamente si rinnovano nel corso della vita postnatale rigenerando in media 8-10 volte (Fig. 12-2). Questa capacità è dovuta alla presenza di **cellule staminali** nella parte permanente del follicolo ovvero nella guaina esterna del pelo e più precisamente in un piccolo **rigonfiamento** appena al di sotto del dotto della ghiandola sebacea. Finita la fase di crescita (fase anagen), che può durare dai 2 ai 7 anni, le cellule della matrice germinale degenerano e il pelo comincia a re-

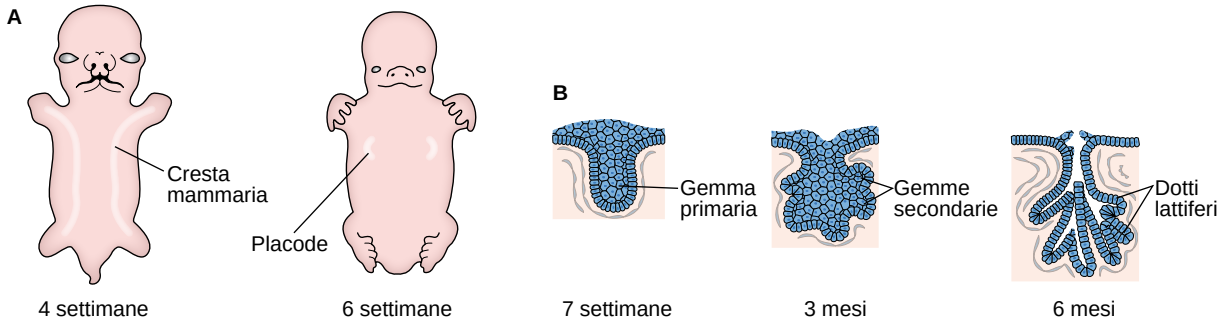



**Figura 12-3** ■ Sviluppo della ghiandola mammaria. *A)* Visione ventrale di un embrione a 4 settimane e 6 settimane. *B)* Stadi di sviluppo della ghiandola mammaria prima della nascita.

gredire (fase catagen) fino a portare in 2-3 settimane la papilla dermica in prossimità del rigonfiamento. Nei successivi 2-3 mesi, mentre il pelo si prepara alla caduta, le cellule della papilla dermica mandano segnali al rigonfiamento del pelo inducendo la proliferazione delle cellule staminali e il reclutamento di cellule staminali transienti che vanno a costituire una nuova matrice germinale (fase telogen). Questa darà inizio ad un nuovo ciclo che rigenererà il pelo. Dal mesenchima che circonda il pelo differenziano cellule muscolari lisce che vanno a formare il **muscolo erettore** del pelo associato alla guaina dermica della radice.

## Sviluppo delle ghiandole

La maggior parte delle **ghiandole sebacee** origina quattro settimane dopo l'inizio dell'allungamento del pelo come un'evaginazione della sua guaina esterna, in prossimità della superficie. In particolari regioni del corpo prive di peli, le ghiandole sebacee si formano per gemmazione dall'epidermide. La gemma si ramifica nel derma dando origine ai dotti e agli acini. Questi ultimi secernono un olio lubrificante attraverso un meccanismo olocrino, che determina la rottura della membrana cellulare e la morte della cellula stessa. Cellule staminali proliferanti poste alla base dell'acino mantengono l'omeostasi della ghiandola.

Le **ghiandole sudoripare merocrine** che secernono il sudore, un composto acquoso contenente sali minerali, grassi e sostanze di rifiuto, sviluppano verso la 20ª settimana come gemme dello strato germinativo dell'epidermide. La gemma si invagina nel derma formando un tubulo terminalmente convoluto che differenzia sia in **cellule secernenti** che in **cellule mioepiteliali**.

Le **ghiandole sudoripare apocrine**, il cui secreto comprende la porzione apicale del citoplasma della cellula, sviluppano in associazione con i peli su tutta l'epidermide fetale, ma poco prima della nascita regrediscono tranne che al livello delle ascelle, monte del pube, scroto, prepuzio e piccole labbra. Queste ghiandole diventano però attive soltanto alla pubertà producendo una miscela di sostanze che viene elaborata dai batteri in un composto odoroso.

Le **ghiandole mammarie** sviluppano da ispessimenti ectodermici bilaterali che compaiono durante il secondo mese e che si estendono dalla radice dell'arto superiore (futuro cavo ascellare) all'attacco dell'arto inferiore (futura regione inguinale), dette **creste mammarie** o **linee del latte** (Fig. 12-3). Esse vanno incontro a regressione tranne che in una piccola regione toracica dove formano i **placodi mammari** di forma lenticolare che successivamente si invaginano ed espandono nel mesenchima sottostante formando ognuna una **gemma primaria**. Durante il 3° mese la gemma raggiunge il primitivo pannicolo adiposo, e sotto l'influenza di questo inizia a ramificare formando le **gemme secondarie**. Prima della nascita le ghiandole mammarie sono uguali nel maschio e nella femmina e consistono ciascuna di circa 20 **dotti lattiferi** che si aprono in una fossetta. In poche settimane, la proliferazione del mesoderma sottostante trasforma la fossetta nel capezzolo estroflesso e la pelle che lo circonda prolifera per formare l'areola. Durante l'infanzia, la mammella subisce una involuzione, ma alcune strutture duttali persistono. Alla pubertà nella femmina la produzione di estrogeni da parte dell'ovaio promuove un'elevata ramificazione dei dotti, mentre nel maschio la ghiandola rimane quiescente. La terza fase di sviluppo si verifica solamente durante la gravidanza, durante la quale l'elevata quantità di **progesterone**, insieme con la **prolattina** e il **lattogeno placentare**, stimola lo sviluppo degli alveoli secretori alla terminazione dei dotti. Dopo il parto, la prolattina prodotta dall'adenoipofisi, stimola la secrezione di proteine e lipidi che compongono il latte, e l'**ossitocina** prodotta dalla neuroipofisi in risposta alla suzione induce la contrazione delle cellule mioepiteliali facilitando la fuoriuscita del latte. Lo stimolo della suzione blocca anche la produzione del GnRH (Gonatotropin Releasing Hormone) al livello ipotalamico, e quindi l'ovulazione e la possibilità di concepire durante l'allattamento fino allo svezzamento.

## Sviluppo delle unghie

Le unghie originano da un'area ispessita ectodermica posta, tra il terzo e il quarto mese, all'apice delle dita delle mani e dei piedi e che subito dopo si allarga sulla fac-

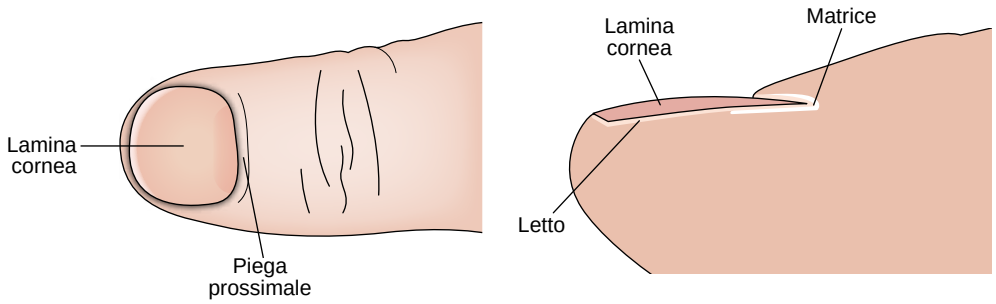



**FIGURA 12-4** ■ Schema delle componenti strutturali dell'unghia della mano.

cia dorsale delle dita per formare il **letto ungueale**, che viene circondato da pieghe epidermiche. Lo strato germinativo della piega prossimale, detto **matrice ungueale**, cresce al di sopra del letto e cheratinizza formando la **lamina cornea** (Fig. 12-4). Poche settimane prima della nascita le unghie raggiungono la punta delle dita.

## PROCESSI E MOLECOLE

### *Induzione e sviluppo dell'epidermide e degli annessi*

Studi condotti su embrioni di pollo, anfibio e topo indicano che la decisione dell'ectoderma di differenziare in senso epiteliale piuttosto che in quello neuronale è dettata dall'aumento di espressione e dall'attivazione della via di segnalazione di **BMP4** (bone morphogenetic protein 4), un fattore di crescita della famiglia del TFGβ (Fig. 12-5). Successivamente il mesenchima, attraverso segnali ancora non identificati, induce la stratificazione dell'epitelio. Uno dei geni attivati e principalmente coinvolti è **p63** che codifica per un fattore di trascrizione con attività mitogenica espresso nelle cellule staminali dello strato germinativo. Topi sperimentalmente privati del gene p63 non formano lo strato intermedio tra lo strato basale e il periderma e come conseguenza della mancata formazione dell'epidermide, muoiono subito dopo la nascita per rapida disidratazione. Inoltre, gli arti sono assenti o troncati perché non si forma la cresta apicale ectodermica, né sono presenti gli annessi epidermici. In accordo, mutazioni eterozigoti per questo gene nell'uomo producono diverse sindromi displasiche dell'ectoderma (vedi paragrafo "Aspetti clinici"). L'attivazione della via di segnalazione del recettore **Notch** è invece necessaria per l'uscita dal ciclo proliferativo e per il differenziamento dello strato spinoso, inclusa l'induzione dell'espressione di cheratine Krt1 e Krt10 e dell'involucrina. Infatti, l'inattivazione di questo recettore provoca un'eccessiva proliferazione dello strato soprabasale. Sono stati inoltre identificati due geni, *Ifr6* (interferon regulatory factor 6) e *Ikk*α (inhibitor of NF-kB kinase alpha), importanti per il differenziamento dello strato granuloso e dello strato corneo. In loro assenza lo sviluppo si arresta alla formazione dello strato spinoso.

Le cellule staminali dello strato germinativo possono intraprendere una via differenziativa diversa dall'epider-

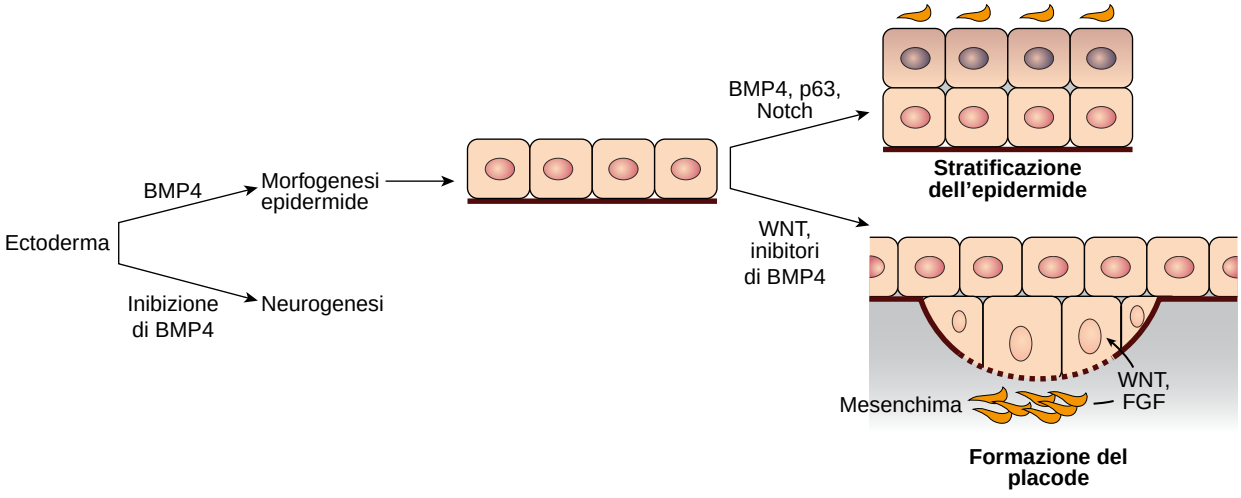



**FIGURA 12-5** ■ Vie di segnalazione coinvolte nel differenziamento dell'epidermide e degli annessi.

mide e dare origine ai placodi, quegli ispessimenti epidermici che si approfondano nel derma dando origine agli annessi cutanei. La regolazione nel tempo e nello spazio di tutti gli annessi dipende dalla specificazione del mesenchima sottostante, che produce molecole segnale ancora non completamente identificate ma che comprendono alcune isoforme dei fattori di crescita **WNT** (wingless and int) e di **FGF** (fibroblast growth factor) (Fig. 12-5). Le nostre maggiori conoscenze sono relative allo sviluppo del bulbo pilifero nel quale è stato chiaramente dimostrato che il mesenchima induce l'espressione nelle cellule epiteliali di specifici isotipi di WNT che agiscono in modo autocrino, portando alla stabilizzazione e al trasferimento nel nucleo del fattore di trascrizione **β-catenina**. DKK1 (Dickkopf), un inibitore di WNT, è prodotto soltanto nell'epidermide interfollicolare e una sua indiscriminata espressione indotta sperimentalmente impedisce la formazione di peli su tutta la superficie. La delezione di β-catenina nelle cellule epiteliali provoca gli stessi effetti, mentre l'espressione costitutiva di β-catenina produce un eccesso di peli. La segnalazione di WNT/β-catenina induce l'espressione di **EDA** (ectodisplasina) e del suo recettore **EDA-R** che, a loro volta, promuovono l'espressione di **inibitori di BMP4**. Infatti, mentre BMP4 è essenziale per il differenziamento dell'ectoderma in epidermide, successivamente la sua inibizione è importante per specificare le aree di sviluppo dei placodi. Il complesso EDA/EDA-R induce inoltre l'espressione del fattore SHH (Sonic hedgeog) che promuove sia il differenziamento del mesenchima in papilla dermica, che la proliferazione delle cellule del placode.

Le vie di segnalazione WNT/β-catenina e EDA-R sono attivate anche durante lo sviluppo dei denti e delle ghiandole, suggerendo che meccanismi di interazione simili a quelli descritti sono coinvolti anche nello sviluppo di queste strutture.

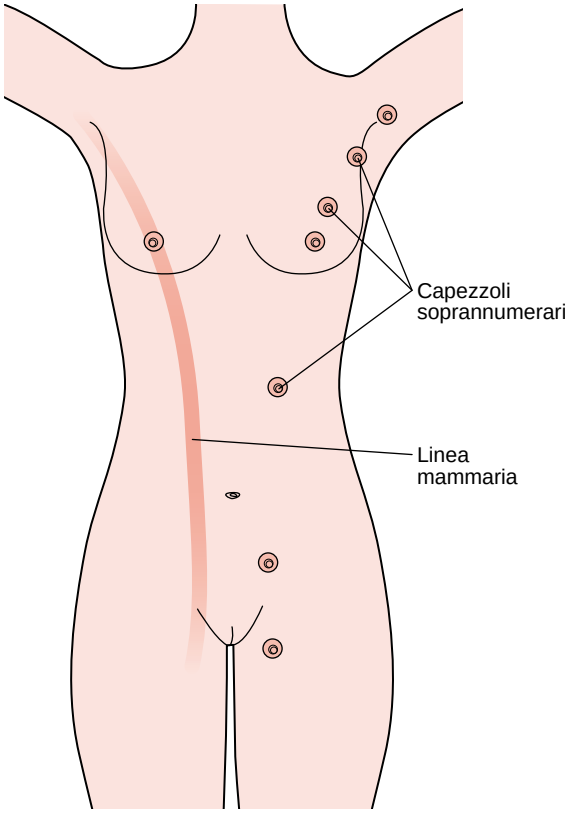



**Figura 12-6** ■ Schema della localizzazione ectopica più frequente di capezzoli soprannumerari. La linea colorata indica la posizione originale della cresta mammaria di sinistra.

## Sviluppo della ghiandola mammaria

Lo sviluppo della ghiandola mammaria in tutti i mammiferi inizia dalla formazione bilaterale delle **linee** o **creste mammarie** poste in posizione ventro-laterale da cui successivamente si formano un numero di coppie di placodi variabile a seconda della specie. La formazione di tessuto mammario ectopico si presenta nello 0,4-6% della popolazione. Nella maggior parte dei casi capezzoli (politelia) o mammelle (polimastia) soprannumerarie sviluppano proprio lungo queste linee (Fig. 12-6). L'espressione del fattore di trascrizione **TBX3** (T box transcription factor 3) nelle creste mammarie è critico per l'attivazione della via di segnalazione **WNT/β-catenina e EDA-R,** entrambi necessari per il differenziamento dei **placodi mammari**. Nei topi privi del gene *Tbx3* i placodi di tutte e cinque le coppie di mammelle non si formano mentre nei topi eterozigoti e nelle donne con aploinsufficienza (mancanza di uno dei due alleli del gene) di *Tbx3* è presente una severa ipoplasia mammaria, accoppiata ad una deficienza dello sviluppo degli arti superiori (sindrome ulnare-mammaria). In base alla sperimentazione effettuata su topi mutanti è possibile ipotizzare che FGF-10 secreto dalle cellule dell'estensione ventrale ipoassiale dei somiti fornisca un segnale verticale puntiforme che si integra con quello laterale dei WNT prodotti dall'ectoderma e mesoderma dorso-laterale per aumentare TBX3 in zone circoscritte della linea mammaria (Fig. 12-7). BMP4, prodotto invece dall'ectoderma e dal mesenchima ventrale, inibirebbe l'espressione di TBX3, impedendo l'eccessiva ventralizzazione dei placodi. L'ulteriore sviluppo della **gemma mammaria** è dipendente dalla produzione da parte dell'ectoderma del **PTHrP** (parathyroid hormone-related peptide), il quale stimola il sottostante mesenchima, che ne esprime il recettore (PTHR1), a produrre fattori che promuovono ulteriormente la proliferazione dell'epitelio. In topi mutanti per PTHrP, o il suo recettore PTHR1, le gemme mammarie si formano, ma non sviluppano e nell'uomo, la mutazione di PTHR1, attraverso il quale agisce anche l'ormone paratiroideo, provoca la **condrodisplasia di Blomstrand**, una sindrome che presenta difetti di ossificazione associati a mancato sviluppo dei capezzoli e delle mammelle.

## Origine dei melanoblasti

È da tempo noto che i melanoblasti, i precursori dei melanociti, differenzino dalle cellule delle **creste neurali** che migrano in direzione dorso-laterale, tra l'ectoderma e il somite. Tuttavia, recenti studi, condotti nell'embrione di

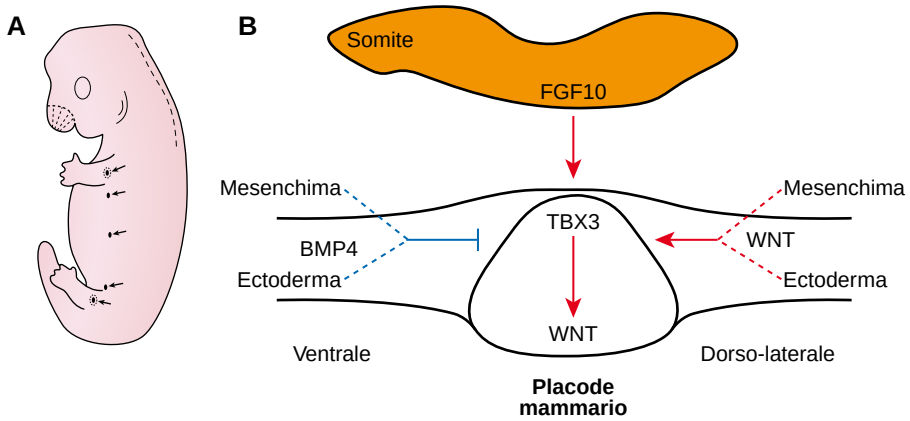



**FIGURA 12-7** ■ Vie di segnalazione coinvolte nello sviluppo dei placodi mammari. *A)* Visione laterale di un embrione di topo a circa 12 giorni di sviluppo e dei cinque placodi mammari di sinistra. *B)* Schema di sezione trasversale della pelle al livello di un placode mammario e vie di segnalazione coinvolte nel suo sviluppo. Fgf10 secreto dai somiti e Wnts prodotti dall'ectoderma e mesoderma dorso-laterale aumentano in modo focale l'espressione di Tbx3 lungo la linea mammaria. L'espressione di Tbx3 è limitata ventralmente dall'azione antagonista di BMP4 prodotto dall'ectoderma e mesoderma ventrale. Tbx3 stimola l'espressione di Wnts e la formazione dei placodi.

pollo e di topo, suggeriscono che un numero sostanziale di queste cellule derivi dalle cellule delle creste neurali che migrano ventralmente, cioè tra il somite e il tubo neurale, e che danno origine ai **precursori delle cellule di Schwann** associati ai nervi periferici in allungamento (Fig. 12-8). Infatti sono state osservate, in vicinanza delle terminazioni delle fibre nervose che si proiettano verso la pelle, delle cellule che oltre ad esprimere *Sox10,* un gene comune ai precursori delle cellule di Schwann (Sry-box 10) e ai melanoblasti, esprimono anche *Mitf* (microphthalmia-associated transcription factor), un gene esclusivo dei melanoblasti che regola la melanogenesi. Sembra che i melanociti derivino da quelle cellule progenitrici delle cellule di Schwann che perdono il contatto con il nervo, stabilito tramite il loro recettore ERBB3 (v-erb-b2 avian erytroblastic leukemia viral oncogene homolog 3) e la Neuregulina presente sulla membrana dell'assone. Questa diversa via differenziativa dei melanociti potrebbe spiegare l'associazione tra alterazione della pigmentazione della pelle e disordini neurologici, come ad esempio è stato osservato nei pazienti con neurofibromatosi di tipo 1.

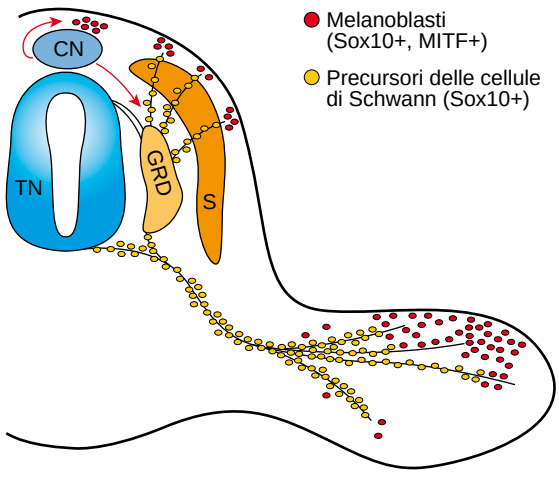



**FIGURA 12-8** ■ Vie di migrazione delle cellule delle creste neurali e loro differenziamento in melanociti. Le frecce indicano la via di migrazione dorso-laterale e quella ventrale delle cellule delle creste neurali. CN, cresta neurale; TN, tubo neurale; GRD, ganglio della radice dorsale; S, somite.

## *Origine delle cellule di Merkel*

È stato per lungo tempo oggetto di dibattito se le cellule di Merkel derivassero dalle cellule neurali o dalle cellule staminali epidermiche. Interessanti studi sono stati recentemente fatti nei topi sul destino di queste cellule mediante tracciamento genetico. L'espressione di una proteina fluorescente è stata resa dipendente da quella di un gene specifico della cellule delle creste neurali, cioè Wnt1, oppure da quella di un marcatore delle cellule staminali dei cheratinociti, cioè *Krt14* (Keratin 14). L'analisi dell'epidermide ha chiaramente mostrato cellule di Merkel fluorescenti soltanto nei topi in cui l'espressione della proteina fluorescente era dipendente da Krt14. Dunque, sembra che le cellule di Merkel derivino dallo **strato germinativo dell'epidermide** e non dalla cresta neurale. A supporto di questa conclusione, è stato dimostrato che la delezione condizionale del fattore di trascrizione ATOH1/MATH1 (atonal homolog 1/mouse atonal homolog 1) nelle cellule staminali dei cheratinociti provoca la completa assenza delle cellule di Merkel in tutte le regioni del corpo.

# ASPETTI CLINICI

## *Malattie ereditarie della pelle*

L'interazione dei filamenti di cheratina con le proteine di giunzione che compongono i desmosomi è essenziale

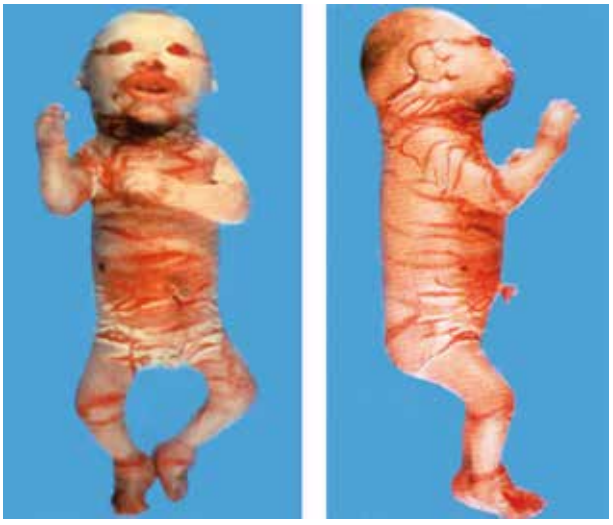


**Figura 12-9** ■ Feto arlecchino. (*Da* E. Gilbert-Barness, D. Debich-Spicer, Embryo and fetal pathology. Cambridge University Press, 2004.)

per la maturazione dei cheratinociti e per l'integrità della pelle. È per questo che mutazioni a carico di queste proteine portano a sindromi di fragilità della pelle, che si manifesta come una vescica o distacco della epidermide al livello dello strato interessato. Per esempio, la mutazione dominante negativa nei geni *Krt5* e *Krt14*, provoca l'**epidermide bollosa semplice**, in cui si formano vescicole nello strato germinativo, che specificamente esprime queste cheratine. La mutazione dei geni *Krt1* e *Krt10* espresse nei cheratinociti postmitotici provoca un analogo fenomeno nello strato soprabasale, sindrome nota come **eritroderma ittiosiforme congenito bolloso**. Disordini della cute caratterizzati da pelle secca e ispessita vengono definiti come **ittiosi**. La più grave forma di ittiosi è quella definita **feto arlecchino** che porta spesso alla morte subito dopo la nascita. Questi bambini hanno difetti nella regolazione nello strato granuloso della formazione dei granuli lamellari contenenti fosfolipidi. La maturazione difettiva dei cheratinociti porta alla formazione di una pelle spessa che alla nascita si disidrata e forma delle grosse placche che conferiscono al neonato un aspetto grottesco (Fig. 12-9). L'**ittiosi lamellare**, legata alla mutazione della transglutaminasi 1 che è responsabile del legame crociato tra le proteine dell'involucro, produce invece una membrana traslucida che si stacca in circa due settimane dalla nascita rivelando un aspetto a scaglie sottili della pelle.

L'importanza del gene p63 e della proteina EDA nonché del suo recettore EDAR nelle fasi iniziali dello sviluppo dell'epidermide e dei suoi annessi evidenziata prima nel topo è stata confermata anche nell'uomo. Infatti, in accordo con i dati sperimentali ottenuti negli animali, mutazioni eterozigoti di questi geni nell'uomo inducono un alterato sviluppo di tutti i derivati ectodermici, producendo sindromi di **displasia ectodermica**, malattie congenite caratterizzate da anomalie di due o più strutture ectodermiche, ad esempio capelli scarsi e fragili, denti piccoli e malformati, assenza di unghie e poche ghiandole sudoripare e sebacee (Fig. 12-10).

L'**albinismo** è un'anomalia ereditaria che consiste nella deficienza di pigmentazione dell'epidermide, dei peli e dei capelli, nella pelle, e dell'iride e della coroide nell'occhio.

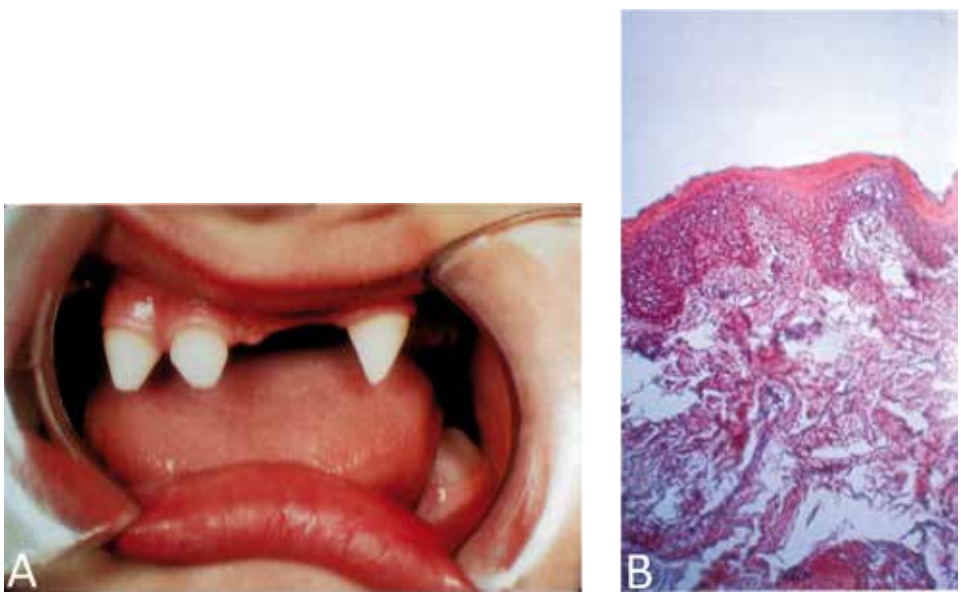



**Figura 12-10** ■ Paziente affetto da displasia ectodermica ipoidrotica. *A)* Visione frontale che mostra anomalie dei denti. *B)* Sezione istologica della cute che mostra assenza di peli e ghiandole. (*Da* E. Gilbert-Barness, D. Debich-Spicer, Embryo and fetal pathology. Cambridge University Press, 2004.)

Negli albini i melanociti sono presenti in quantità normali ma sono privi di pigmentazione perché non esprimono il gene che codifica per l'enzima tirosinasi, che è coinvolto nella conversione dell'aminoacido tirosina in melanina. Raramente i difetti di pigmentazione riguardano tutto il corpo (albinismo totale o oculo-cutaneo) mentre è più frequente che sia circoscritto ad una regione cutanea, o ad un solo occhio (albinismo parziale).

## Letture consigliate


Adameyko I e coll. Schwann cell precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin. Cell 139, 366-379, 2009.

Benjamin D e coll. Skin and hair: models for exploring organ regeneration. Human Molecular Genetics 17, Review Issue 1, 54-59, 2008.

Brunner HG e coll. P63 gene mutations and human developmental syndromes. American Journal of Medical Genetics 112, 284-290, 2002.

Chorro L, Geissmann F. Development and homeostasis of 'resident' myeloid cells: the case of the Langerhans cell. Trends of Immunology 3, 438-445, 2010.

Cowin P, Wysolmerski J. Molecular mechanisms guiding embryonic mammary gland development. Cold Spring Harbor Perspective Biology, 2010.

Fuchs E. Skin stem cells: rising to the surface. The Journal of Cell Biology, 180, 273-284, 2008.

Lane EB, McLean WH. Keratins and skin disorders. Journal of Pathology 204, 355-366, 2004.

O'Shaughnessy RF, Christiano AM. Inherited disorders of the skin in human and mouse: from development to differentiation. International Journal of Developmental Biology 48, 171-179, 2004.

Sennett R, Rendl M. Mesenchymal-epithelial interactions during hair follicle morphogenesis and cycling. Seminars in Cell and Developmental Biology 23, 917-927, 2012.

Woo SH. Identification of epidermal progenitors for the Merkel cell lineage. Development 137, 3965-3971, 2010.

13

# Lo sviluppo del sistema nervoso

Amelio Dolfi e Antonio Musarò

## CENNI DI ANATOMIA ED ISTOLOGIA DEL SISTEMA NERVOSO

### Le cellule del sistema nervoso

Il sistema nervoso è costituito dalle **cellule nervose** o **neuroni** e dalle cellule della **nevroglia** o **glia** (oltre che dai vasi sanguigni e dai rivestimenti connettivali). I neuroni rappresentano le unità morfofunzionali elementari del tessuto nervoso; ciascuno di essi è costituito da un **corpo cellulare** o **soma** contenente il nucleo e i vari organelli che rendono questa porzione la centrale metabolica e di controllo delle attività di tutta la cellula, i **dendriti**, che costituiscono l'apparato ricettivo del neurone stesso ampliando la superficie della cellula e di conseguenza aumentandone le possibilità di stabilire connessioni e infine l'**assone**, che rappresenta il prolungamento della cellula nervosa adatto per inviare i segnali nervosi anche a notevole distanza dal corpo cellulare. Per svolgere nella maniera migliore la sua funzione, l'assone è, di solito, ricoperto da rivestimenti isolanti come la guaina mielinica e la guaina di Schwann o nevrilemma. L'assone circondato dai suoi rivestimenti costituisce la cosiddetta **fibra nervosa**.

Esistono tre tipi principali di neuroni funzionalmente distinti: i **neuroni motori**, i **neuroni sensitivi** e i **neuroni associativi**. Come noto, i neuroni formano delle complesse reti funzionali integrate all'interno delle quali essi formano dei contatti specializzati chiamati **sinapsi** mediante i quali essi trasmettono l'impulso nervoso comunicando tra loro. I neuroni possono formare sinapsi anche con altri tipi cellulari, in particolare con le cellule muscolari e con alcune cellule ghiandolari.

Le cellule della nevroglia sono rappresentate da diverse popolazioni cellulari con diversa origine e funzione: gli **astrociti**, gli **oligodendrociti**, le **cellule ependimali** (nel complesso denominate **macroglia**), le **cellule microgliali**, le **cellule di Schwann** e le **cellule satelliti**. Nel loro insieme le cellule gliali formano una rete di sostegno e di isolamento nei confronti dei neuroni e dei loro prolungamenti riempiendo tutti gli spazi compresi tra una singola cellula nervosa e l'altra e svolgendo funzioni metaboliche, trofiche e di difesa.

Infine bisogna menzionare le **cellule radiali gliali** che, come evidenziato recentemente, si trovano a cavallo tra i neuroni e le cellule gliali; infatti, dopo avere svolto un ruolo importante nel dirigere la migrazione dei neuroblasti in fase differenziativa durante il periodo embrionale, possono differenziare a loro volta sia in astrociti che in neuroblasti (vedi prossimi paragrafi).

### Organizzazione del sistema nervoso

Il sistema nervoso può essere suddiviso schematicamente in **sistema nervoso centrale** (**SNC**) e **sistema nervoso periferico** (**SNP**). Il primo è costituito dall'encefalo e dal midollo spinale. L'encefalo è contenuto nella scatola cranica ed è costituito dal **cervello** (Fig. 13-1), dal **tronco encefalico** e dal **cervelletto**. Il **midollo spinale** (Fig. 13-2) è accolto all'interno della colonna vertebrale. Il sistema nervoso periferico è costituito dai **nervi cranici**, dai **nervi spinali** e dai **gangli** (Fig. 13-3). Oltre a questa prima distinzione di carattere morfologico possiamo suddividere il sistema nervoso anche da un punto di vista funzionale in **sistema nervoso della vita di relazione**, che controlla le percezioni coscienti e le funzioni motorie volontarie dando quindi al corpo umano la capacità di mettersi in relazione con il mondo che lo circonda e **sistema vegetativo** che, invece, controlla le cosiddette funzioni viscerali come il battito cardiaco, la motilità del tubo digerente, il tono vascolare e altre.

### Sostanza bianca e sostanza grigia

Nelle varie porzioni del sistema nervoso centrale sono presenti, con aspetti organizzativi diversi, la **sostanza grigia**, dove prevalgono i corpi cellulari delle cellule nervose e la **sostanza bianca** in cui invece prevalgono i prolungamenti dei neuroni ricoperti dalla **guaina mielinica** ricca di materiali lipidici. Proprio l'abbondanza di sostanze lipidiche della mielina conferisce alla sostanza

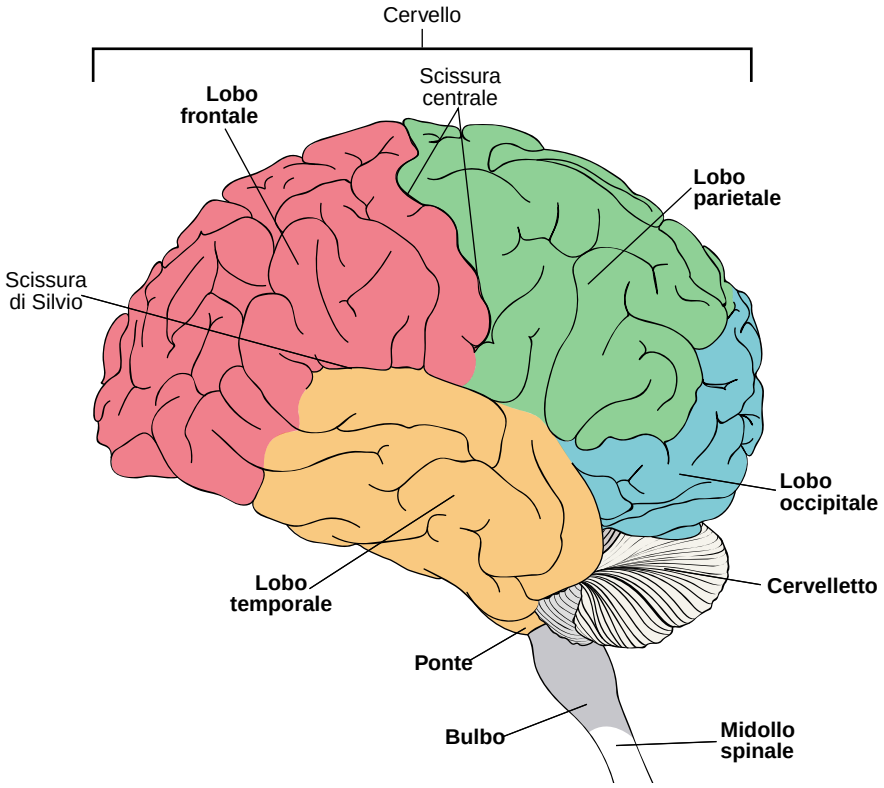



**Figura 13-1** ■ Aspetto esteriore del cervello. Si osservano i lobi cerebrali e alcune strutture del sistema nervoso centrale.

bianca l'aspetto biancastro rilevabile all'osservazione macroscopica.

## Emisferi cerebrali

Il cervello è costituito dai due **emisferi cerebrali**, che ne rappresentano la parte preponderante e sono ricoperti a tutti i livelli dalla **corteccia cerebrale**; la loro superficie esterna, visibile all'osservazione diretta del cervello, è caratterizzata da numerosi **solchi** (o scissure) e **circonvoluzioni**. I solchi più profondi contribuiscono a delimitare gli emisferi cerebrali in **lobi** (Fig. 13-1). Ciascun emisfero risulta quindi suddiviso in **lobo frontale**, **lobo parietale**, **lobo temporale**, **lobo occipitale** e **lobo dell'insula**. La corteccia risulta formata da sostanza grigia derivata dalla disposizione in diversi strati delle cellule nervose; nella corteccia cerebrale dell'uomo sono presenti sei strati. Al di sotto della corteccia cerebrale, gli emisferi contengono numerosissimi prolungamenti dotati di guaina mielinica derivati da o diretti a neuroni della corteccia stessa. L'insieme di questi prolungamenti forma la sostanza bianca degli emisferi cerebrali.

## Diencefalo, tronco encefalico, cervelletto e midollo spinale

Il **diencefalo** è una regione dell'encefalo posta alla base degli emisferi cerebrali e da essi racchiusa. Esso è suddiviso in **epitalamo**, **talamo** e **ipotalamo**; da quest'ultimo si estende un piccolo **peduncolo**, **ipotalamo-ipofisario**, che lo collega alla **ghiandola ipofisaria**. Il sistema nervoso centrale è costituito inoltre dal **tronco encefalico** che si estende caudalmente al diencefalo e comprende il **mesencefalo**, il **ponte** e il **midollo allungato** (o bulbo); dorsalmente al ponte e al midollo allungato si trova il **cervelletto** (Fig. 13-1). Infine il midollo allungato si continua con il **midollo spinale** contenuto nel canale (o speco) vertebrale (Fig. 13-2). Lungo le superfici laterali del midollo spinale originano trentuno coppie di nervi spinali i quali, insieme alle dodici coppie dei nervi cranici che originano dal tronco encefalico, formano il sistema nervoso periferico; ciascun **nervo spinale** è dotato di due radici che, una volta fuoriuscite dal midollo, decorrono separatamente in direzione laterale e dopo un breve tratto si uniscono per costituire appunto il nervo spinale (Figg. 13-2 e 13-3).

Per ciascun nervo spinale si distingue quindi la **radice anteriore** o **ventrale** o **motoria**, che contiene i prolungamenti dei neuroni di moto i quali hanno i loro corpi cellulari contenuti nelle colonne ventrali della sostanza grigia del midollo spinale, e la **radice dorsale** o **posteriore** o **sensitiva** che contiene i prolungamenti dei neuroni gangliari i cui corpi cellulari sono invece localizzati al di fuori del midollo spinale, lungo il decorso delle radici posteriori a livello dei **gangli spinali** (Fig. 13-3).

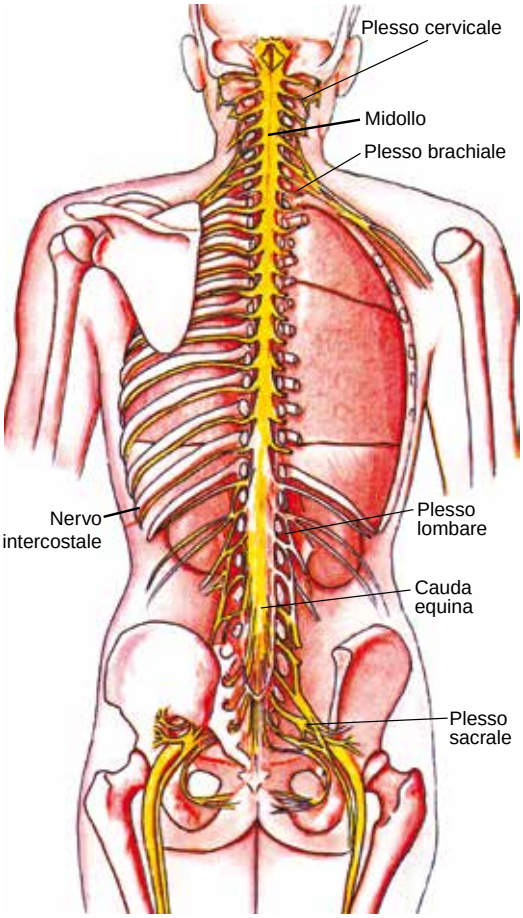



**Figura 13-2** ■ Midollo spinale. Si osserva il midollo spinale contenuto nella colonna vertebrale e i nervi spinali che costituiscono il sistema nervoso periferico. (*Da* G. Goglia, Anatomia umana, Piccin Nuova Libraria, Padova, 1999)

## I ventricoli cerebrali, il liquido cefalorachidiano e le meningi

All'interno del sistema nervoso centrale sono contenute delle cavità. Le cavità che si trovano a livello del cervello e del tronco encefalico prendono il nome di **ventricoli cerebrali**, mentre la cavità che percorre longitudinalmente il midollo spinale si chiama **canale centrale midollare**. I ventricoli cerebrali sono in numero di quattro (Fig. 13-4): il 1° e il 2°, detti anche **ventricoli laterali**, sono contenuti ognuno all'interno di uno dei due emisferi cerebrali; il **III ventricolo** è contenuto all'interno del diencefalo mentre il **IV ventricolo** è collocato tra il ponte e il midollo allungato che ne formano il pavimento e il cervelletto che si sviluppa dorsalmente rispetto alla sua volta. I ventricoli comunicano tra loro: in particolare i due ventricoli laterali che sono speculari comunicano con il III ventricolo, che è impari mediano, per mezzo di due canalicoli denominati **condotti interventricolari** (di Monro); la cavità del III ventricolo a sua volta prosegue in direzione caudale per mezzo di un sottile canalicolo contenuto all'interno del mesencefalo, chiamato **acquedotto cerebrale** (di Silvio); l'acquedotto sfocia poi nel IV ventricolo che termina restringendosi verso il basso dove si continua con il canale centrale del midollo spinale. Il IV ventricolo comunica con lo **spazio subaracnoideo**, cioè lo spazio compreso tra la **pia madre**, la meninge più interna, e l'**aracnoide** o meninge intermedia, per mezzo di due **aperture laterali** (anche denominate forami di Luschka), e un'**apertura mediana** (anche detta foro di Magendie). Il significato dei ventricoli cerebrali e del sistema formato dalle comunicazioni esistenti tra loro e con lo spazio subaracnoideo è quello di intervenire nella produzione e nella circolazione del **liquido cefalorachidiano** o **liquido cerebrospinale** o **li-**

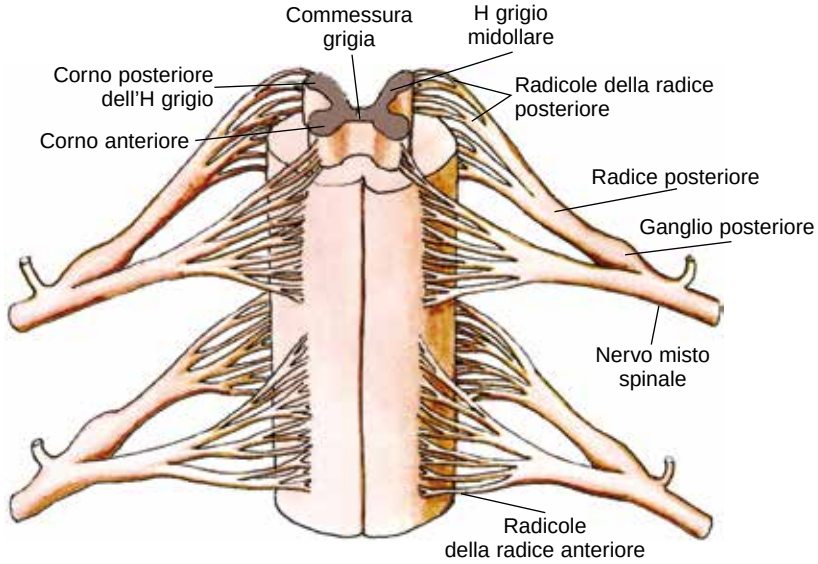



**Figura 13-3** ■ Sezione del midollo spinale. Si nota la distinzione in sostanza bianca e sostanza grigia; sono apprezzabili le radici dei nervi spinali ed i gangli. (*Da* G. Goglia, Embriologia umana, Piccin Nuova Libraria, Padova, 1997)

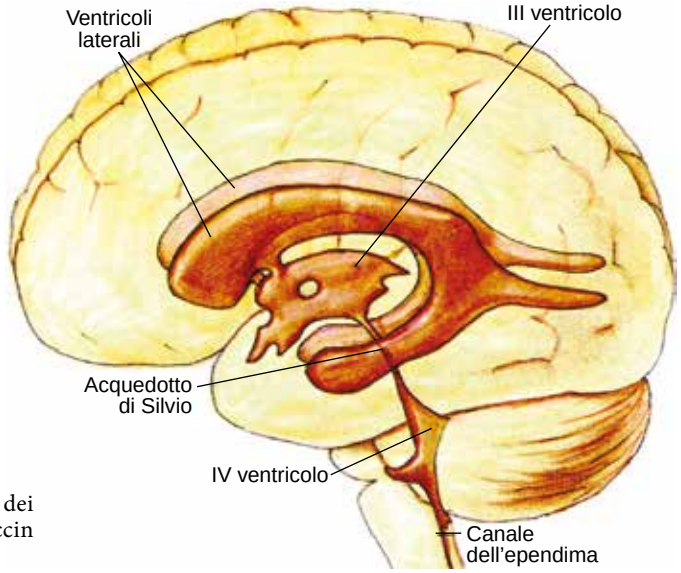



**Figura 13-4** ■ Rappresentazione tridimensionale dei ventricoli cerebrali. (*Da* G. Goglia, Anatomia umana, Piccin Nuova Libraria, Padova, 1999)

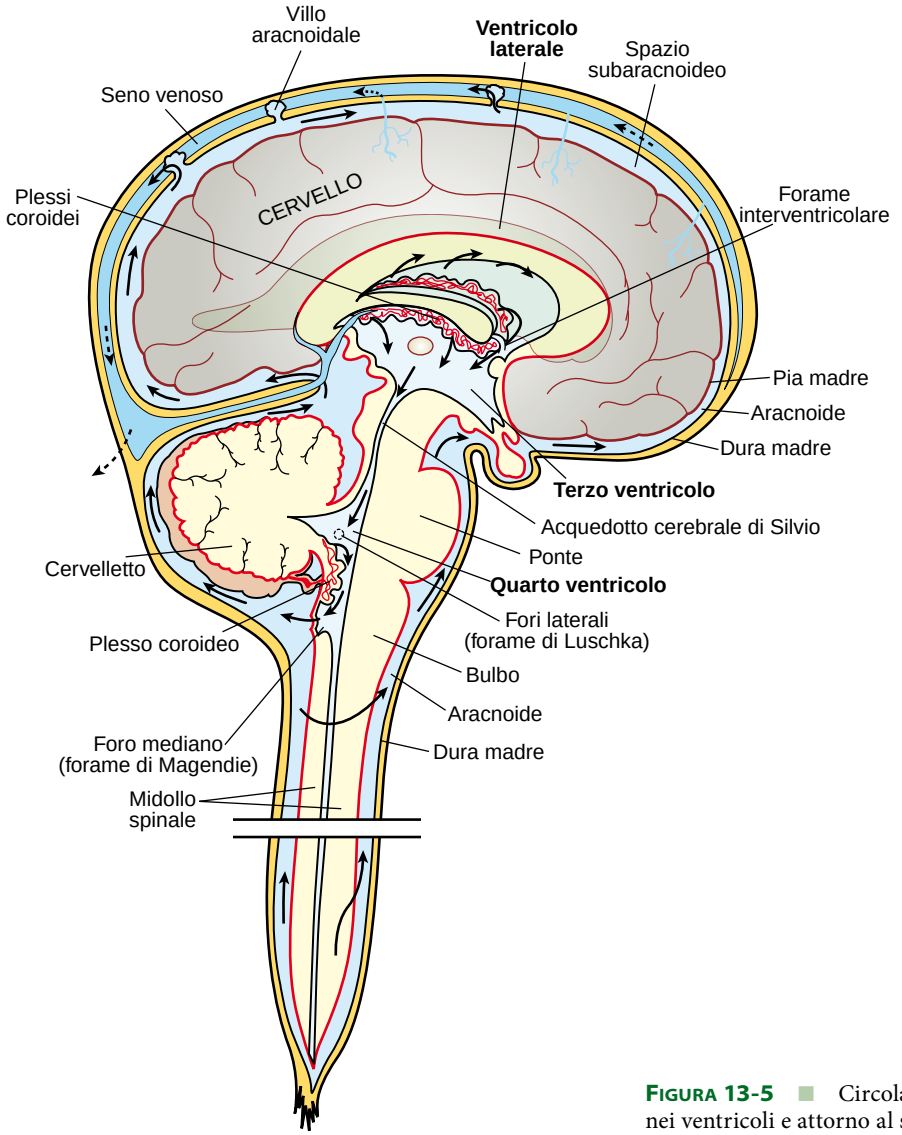



**Figura 13-5** ■ Circolazione del liquido cefalorachidiano nei ventricoli e attorno al sistema nervoso centrale.

**quor**. Il liquido cefalorachidiano costituisce un vero e proprio cuscinetto idraulico a protezione del sistema nervoso (Fig. 13-5). L'encefalo e il midollo spinale sono infatti formati da strutture delicate e non facilmente rigenerabili per cui è necessario proteggerli. A questo scopo sono racchiusi da diversi involucri: il tessuto osseo della scatola cranica e della colonna vertebrale all'esterno, poi la **dura madre** di tessuto connettivo denso che rappresenta la meninge più esterna, l'**aracnoide** o meninge intermedia e la **pia madre** ossia la meninge più delicata posta in intimo contatto con le superfici esterne delle varie parti del sistema nervoso centrale. Il liquido cefalorachidiano è interposto tra pia madre e aracnoide.

## PROCESSI DELLO SVILUPPO DEL SISTEMA NERVOSO

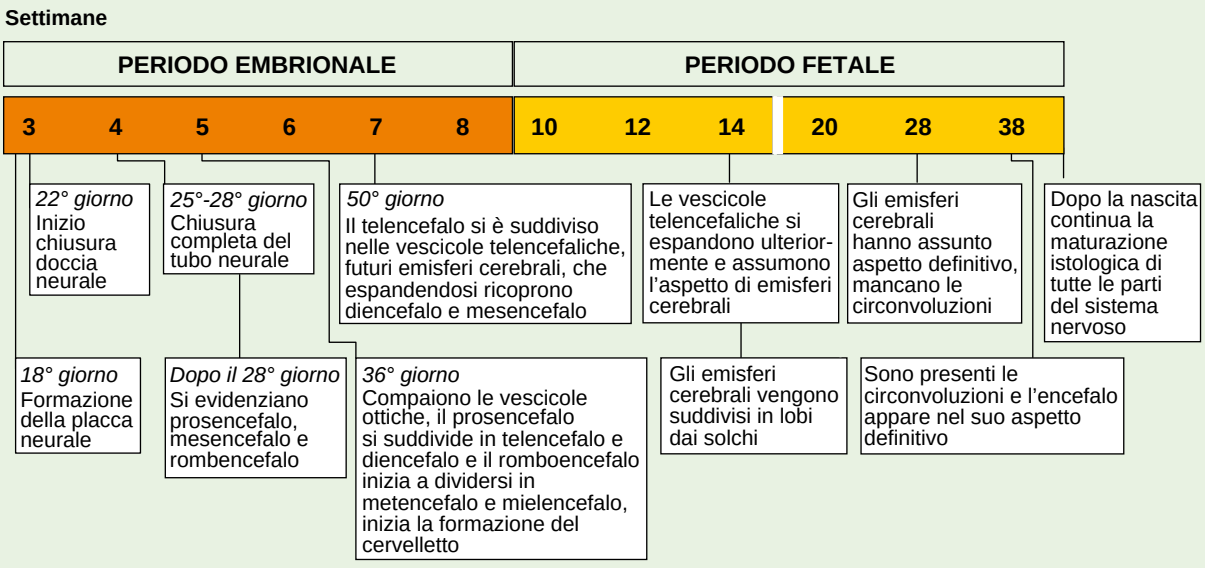
### Formazione della piastra, della doccia, del tubo neurale e delle creste neurali

Il sistema nervoso centrale comincia a svilupparsi dal foglietto ectodermico, a partire dalla 3ª settimana di gestazione, sotto l'influenza e induzione della notocorda e del mesoderma parassiale. Eventi chiave nello sviluppo del sistema nervoso centrale sono: la formazione della **piastra** o **placca neurale**, delle **pieghe neurali** e la chiusura delle pieghe a formare il **tubo neurale**. L'intero processo prende il nome di **neurulazione**. La fase iniziale del processo di sviluppo del sistema nervoso (neurulazione) è caratterizzata da un ispessimento del foglietto ectodermico con formazione di una struttura piatta, chiamata piastra o placca neurale. Essa è localizzata nella regione mediana della parte anteriore del disco ectodermico, vicino al nodo primitivo ed è costituita da cellule epiteliali ispessite che formano il cosiddetto **neuroectoderma** (Fig. 13-6A). Verso la fine della 3ª settimana la piastra neurale, dopo essersi allungata lungo l'asse dell'embrione (Fig. 13-6B), s'invagina sulla linea mediana e solleva i suoi margini laterali dando origine alla **doccia neurale** caratterizzata, ai due lati, dalle pieghe neurali (Fig. 6B,C). Nelle fasi successive, le pieghe neurali si ispessiscono ulteriormente, convergono medialmente e si fondono, trasformando la doccia neurale in una struttura cilindrica munita di cavità centrale: il **tubo neurale** (Fig. 13-6D).

La chiusura del tubo neurale inizia in corrispondenza della regione medio dorsale dell'embrione e procede in direzione cefalica e caudale. Progressivamente il tubo neurale sprofonda al di sotto all'ectoderma che, chiamato ora **epiectoderma** perché darà origine all'epidermide e ai suoi derivati, si richiude sopra di esso. All'estremità craniale e caudale del tubo neurale in chiusura si possono osservare inizialmente due caratteristiche aperture: il **neuroporo anteriore** e il **neuroporo posteriore** in comunicazione con la sovrastante cavità amniotica (Fig. 13-7). La chiusura del neuroporo anteriore si completa tra il 23° e il 25° giorno, quando l'embrione ha raggiunto lo stadio di 18-20 coppie di somiti; la chiusura del neuroporo posteriore si verifica invece tra il 25°e il 28° giorno, allo stadio di 24-25 coppie di somiti.

Recentemente è stato osservato che la regione più caudale del tubo neurale si forma a seguito di un processo diverso da quello sopra descritto chiamato **neurulazione secondaria**. Difatti, alcuni studi sperimentali in modelli animali e l'osservazione di embrioni umani avvalorano l'ipotesi che la regione sacrale e coccigea del tubo neurale origini da una massa di cellule mesodermiche formatesi durante la gastrulazione nella regione caudale dell'embrione, chiamata **eminenza** o **gemma caudale**, che rappresenterebbe un residuo della linea primi-

## TABELLA CRONOLOGICA DELLO SVILUPPO TEMPORALE DEL SISTEMA NERVOSO



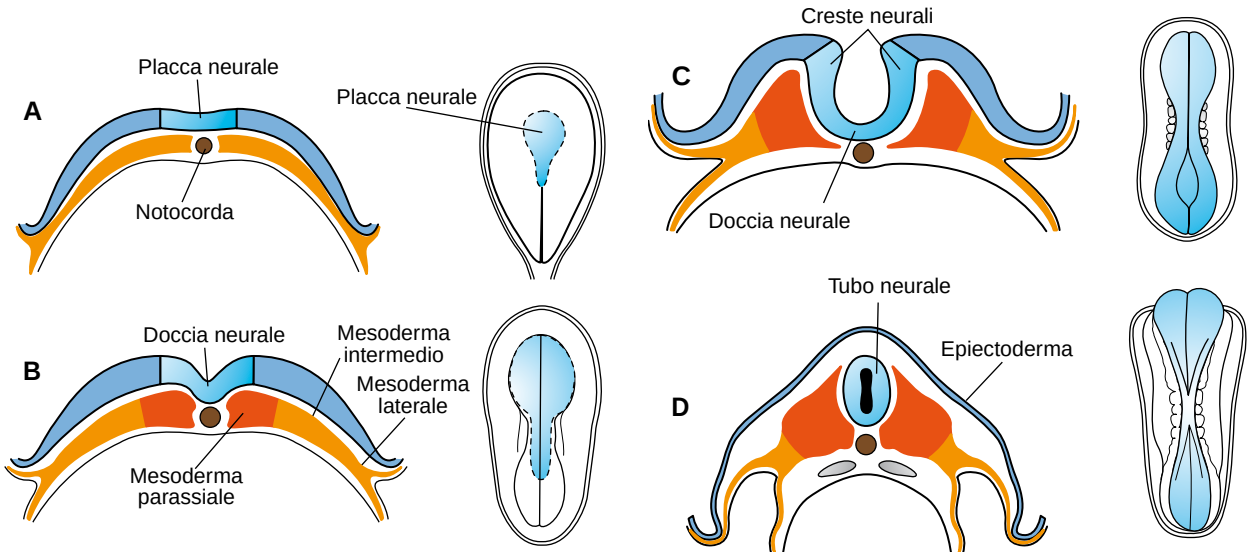



**Figura 13-6** ■ Sezioni trasversali e corrispondenti visioni del dorso di un embrione durante le fasi successive dello sviluppo del tubo neurale evidenziato in celeste. *A)* L'ectoderma si ispessisce sulla linea assiale dorsale mediana formando il neuroectoderma e l'area costituita dalle cellule neuroectodermiche ispessite prende il nome di piastra neurale più espansa nella regione craniale. *B)* La piastra neurale si estende caudalmente; a seguito di modificazioni della forma delle cellule che avvengono lungo il suo asse mediano e nei punti di congiunzione con l'ectoderma, da luogo alla piega neurale che ben presto, a seguito di ulteriore ventralizzazione lungo l'asse mediano e sollevamento lungo i bordi diventa doccia neurale. *C)* La doccia neurale si approfonda ancora di più mentre le pieghe neurali laterali al confine neuro-somatico si avvicinano tra loro lungo la linea mediana per dare luogo alla formazione, prima, del canale neurale e, alla fine, al tubo neurale. *D)* Inizia la saldatura dei bordi della doccia neurale in prossimità dei somiti della regione occipitale; la doccia neurale si è chiusa per formare il tubo neurale e adesso la doccia ha dato luogo al lume del tubo stesso. Al di sopra del tubo neurale l'ectoderma dei due lati si è saldato sulla linea mediana e ha formato il rivestimento del dorso dell'embrione; ai lati del tubo neurale si sono formati i somiti originati dal mesoderma parassiale mentre sotto il tubo neurale decorre la notocorda.

tiva. Le cellule dell'eminenza caudale proliferano e si condensano tra loro formando inizialmente un cordone solido; questo successivamente si cavita e va a fondersi al resto del tubo neurale formatosi dalla piastra neurale per **neurulazione primaria**.

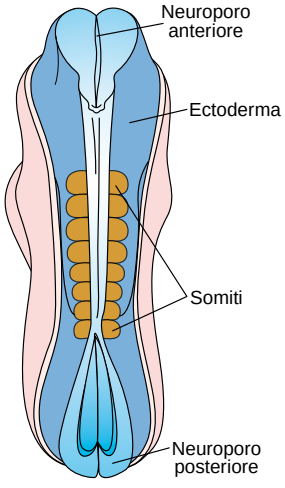



**Figura 13-7** ■ Embrione visto dall'alto dopo che è iniziata la chiusura della doccia neurale in canale neurale; si notano le aperture presenti alle estremità del futuro tubo neurale ovvero il neuroporo anteriore e il neuroporo posteriore.

Appena chiuso, il tubo neurale possiede una parete formata da **cellule neuroepiteliali** organizzate in un epitelio cilindrico pseudostratificato in attiva proliferazione. Come vedremo più avanti, le cellule neuroepiteliali daranno origine prima alle cellule ependimali e alle cellule gliali radiali, quindi ai precursori dei neuroni, chiamati **neuroblasti**. La proliferazione delle cellule neuroepiteliali e delle cellule radiali determina un aumento dello spessore della parete del tubo neurale. A questo punto è possibile distinguere, in ciascuno dei due lati della parete del tubo neurale, una porzione anteriore o ventrale che viene chiamata **lamina basale** e una parte posteriore o dorsale chiamata **lamina alare**. Questa suddivisione è fondamentale in quanto nella lamina basale si formeranno prevalentemente **neuroni motori**, mentre nella lamina alare si differenzieranno **neuroni sensitivi** ed **associativi** o **interneuroni**. Il confine tra lamina basale e lamina alare è delineato dalla presenza di un solco longitudinale chiamato **solco limitante**. Le lamine alari dei due lati del tubo neurale sono unite dorsalmente dalla **lamina del tetto** mentre le lamine basali si fondono ventralmente grazie alla **lamina del pavimento** (Fig. 13-8).

Contemporaneamente alla costituzione del tubo neurale si assiste ad un'ulteriore proliferazione del neuroectoderma delle pieghe neurali, che va a formare le **creste neurali** (o creste gangliari). Le cellule che costituiscono

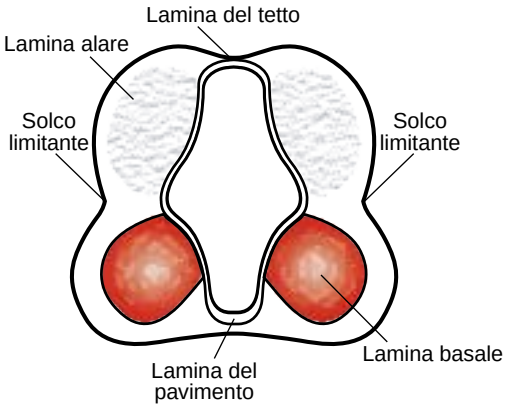



**Figura 13-8** ■ Sezione trasversale del tubo neurale; sono schematicamente rappresentate le porzioni in cui possono essere suddivise le pareti del tubo neurale dopo la chiusura.

queste strutture, dotate di molteplici potenzialità differenziative, vengono oggi considerate cellule staminali multipotenti equivalenti ad un 4° foglietto embrionale (vedi paragrafo "Istogenesi del tessuto nervoso").

Nell'uomo le cellule delle creste neurali presuntive nascono a livello della giunzione neuro-ectodermica da entrambi i lati, quando i margini laterali della doccia neurale non si sono ancora fusi tra loro (Fig. 13-9A).

La proliferazione delle creste neurali si estende, in senso longitudinale, lungo i margini della doccia neurale (Fig. 13-9B) e dà luogo alla formazione di due lamine cellulari che si insinuano lateralmente rispetto alla doccia, una per ciascun lato, tra l'ectoderma che riveste l'embrione e la parete laterale stessa della doccia neurale (Fig. 13-9C). Al momento della chiusura della doccia neurale anche le due lamine, che formano le creste neurali, arrivano a toccarsi lungo la linea mediana. La saldatura interessa così le tre strutture che si stanno avvicinando (Fig. 13-9D). Infatti la saldatura stessa comporta la chiusura della lamina epiectodermica all'esterno; al di sotto dell'ectoderma le lamine delle creste neurali si uniscono in un'unica formazione che mantiene temporaneamente una certa omogeneità ed è situata tra ectoderma e il tubo neurale sottostante (Fig. 13-9E).

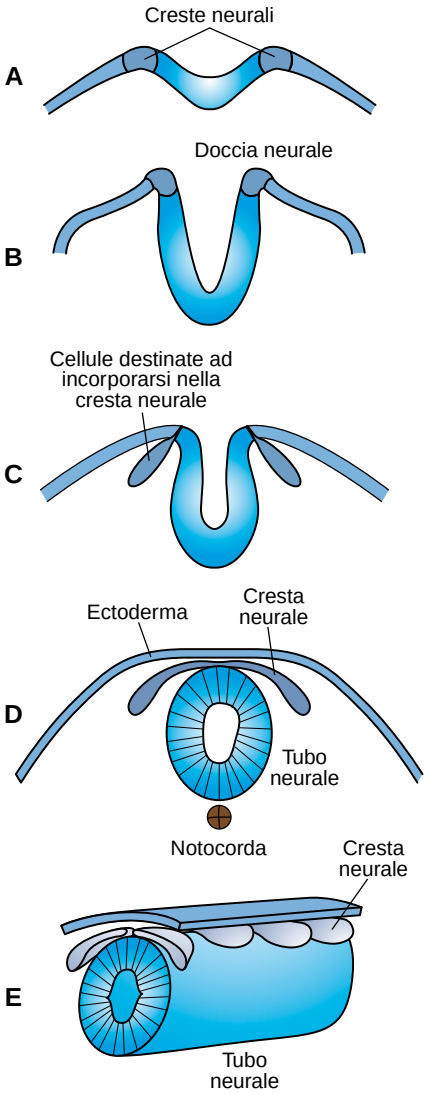



**Figura 13-9** ■ Schema che mostra le fasi della formazione delle creste neurali. *A)* In prevalenza le cellule delle creste neurali originano a livello della giunzione neurosomatica. *B)* Le cellule delle creste neurali si trovano a livello dei bordi della doccia neurale. *C)* Le creste neurali si estendono in senso laterale tra neuroectoderma del tubo neurale ed ectoderma. *D)* Al momento della chiusura del tubo neurale le creste dei due lati si uniscono temporaneamente collocandosi tra ectoderma e tubo neurale. *E)* Le creste neurali si sono segmentate dando origine ai gangli.

## Cervello anteriore, medio e posteriore

Già negli stadi più precoci la porzione anteriore del tubo neurale, dalla quale originerà il futuro cervello, non ha un calibro uniforme. Infatti in questa zona, che deriva dalla parte più craniale e più ampia della piastra neurale (Fig. 13-6A), cominciano a formarsi vari rigonfiamenti: compaiono così tre vescicole primarie ovvero il **cervello anteriore** o **prosencefalo**, il **cervello medio** o **mesencefalo** e il **cervello posteriore** o **rombencefalo** (Fig. 13-10); in questa fase iniziale il rombencefalo è a sua volta suddiviso in otto segmenti più piccoli chiamati **rombomeri** (Fig. 13-11).

La parte restante del tubo neurale si continua caudalmente rispetto alle tre vescicole lungo l'asse mediano dell'embrione e formerà il **midollo spinale**; questa porzione si presenta di calibro abbastanza uniforme con tendenza ad assottigliarsi nella sua parte terminale (Fig. 13-6, B,C,D e Fig. 13-7).

## Evoluzione della parte craniale del tubo neurale

Quando sta per completarsi la chiusura del tubo neurale e cranialmente si sono formate le tre vescicole primarie, si possono notare delle ripiegature del tubo neurale a

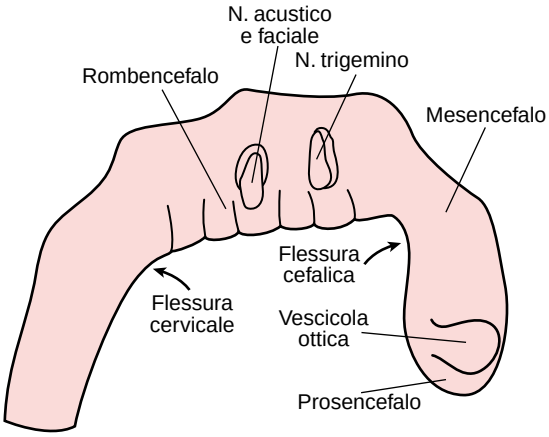



**Figura 13-10** ■ Visione della parte craniale del tubo neurale. Si notano le tre vescicole primarie.

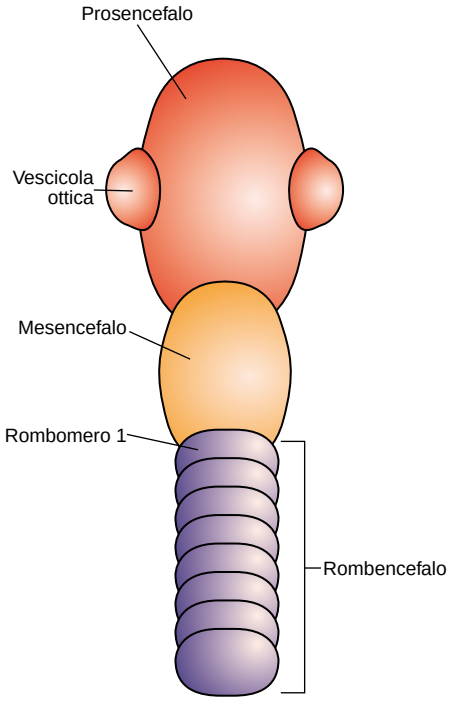



**Figura 13-11** ■ Schema che illustra la suddivisione iniziale del rombencefalo in rombomeri; in rosso prosencefalo, in giallo mesencefalo, in blu rombencefalo suddiviso in 8 rombomeri.

concavità ventrale, dovute al fatto che la sua crescita all'interno dell'embrione trova un campo di estensione limitato in quanto il tubo stesso si accresce lungo l'asse dell'embrione tra due punti fissi rappresentati anteriormente dalla **membrana bucco-faringea** e posteriormente dalla **membrana cloacale**. Le ripiegature del tubo neurale fanno sì che, in una fase iniziale, si possano riconoscere la **flessura cefalica**, in corrispondenza del cervello medio e la **flessura cervicale**, tra cervello posteriore e futuro midollo spinale (Fig. 13-10).

La formazione delle vescicole primarie è accompagnata da una parallela evoluzione del canale neurale originario in esse contenuto, con formazione del **prosocele**, all'interno del cervello anteriore, che darà origine ai ventricoli laterali I e II e al III ventricolo, del **mesocele**, all'interno del cervello medio, destinato a dare origine al dotto mesencefalico o acquedotto di Silvio e del **rombocele** all'interno del cervello posteriore, che darà origine al IV ventricolo (Fig. 13-13A).

## Evoluzione del prosencefalo

Verso la fine della 5ª settimana di sviluppo, il prosencefalo va incontro ad una suddivisione che lo porta a formare due porzioni: dalla lamina alare del prosencefalo si origina il **telencefalo**, situato più in avanti verso la porzione cefalica dell'embrione, dalla lamina basale si forma il **diencefalo**, situato caudalmente rispetto al telencefalo stesso. Il diencefalo si continua caudalmente con il mesencefalo (Fig. 13-12C). Quando lo sviluppo della parte craniale del tubo neurale è completo, da ciascun lato del prosencefalo si estende un rigonfiamento secondario che origina dalla lamina basale e ciò porta alla formazione delle due **vescicole ottiche**, che rappresentano il primo abbozzo dell'organo della vista, gli occhi (Fig. 12A,B,C) (vedi Capitolo 19). Quando nella parete del diencefalo si organizzano gruppi di cellule nervose (chiamati nuclei) e i loro prolungamenti, in esso si possono riconoscere diverse regioni, **epitalamo**, **talamo**, **pretetto** e **ipotalamo**. Dall'ipotalamo si origina un'ulteriore proliferazione ventrale che va a costituire la parte nervosa dell'**ipofisi** (**neuroipofisi**) (Fig. 13-12D). Essa rimarrà collegata all'ipotalamo mediante un peduncolo denominato **peduncolo ipotalamo-ipofisario**. Ben presto il telencefalo viene a sua volta suddiviso nelle due **vescicole telencefaliche**, le quali, in seguito, diventeranno gli **emisferi cerebrali**, una a destra e una a sinistra, collegate tra loro da una porzione intermedia che in basso si continua con il diencefalo. Questa zona di collegamento avrà in seguito un notevole sviluppo e risulterà costituita da un grandissimo numero di prolungamenti nervosi rivestiti di guaina mielinica. Tali prolungamenti formeranno fasci di collegamento tra le varie aree della corteccia dello stesso lato o dei due lati e il loro notevole sviluppo darà luogo tra l'altro ad una struttura posta al di sotto della base dei futuri emisferi cerebrali denominata **corpo calloso**. Contemporaneamente alla suddivisione del cervello anteriore anche la sua cavità originaria, il prosocele, va incontro a nuove suddivisioni: nelle due vescicole telencefaliche destra e sinistra si formano piccole cavità, una per ciascun lato denominate **teloceli laterali**; esse sono destinate ad ingrandirsi e a divenire i futuri **ventricoli laterali** contenuti negli emisferi cerebrali. La cavità compresa fra i due teloceli laterali viene chiamata **telocele mediano**; in basso, essa comunica con la cavità del diencefalo, il **diocele** e insieme ad essa costituirà, in seguito, il **III ventricolo** (Fig. 13-13B).

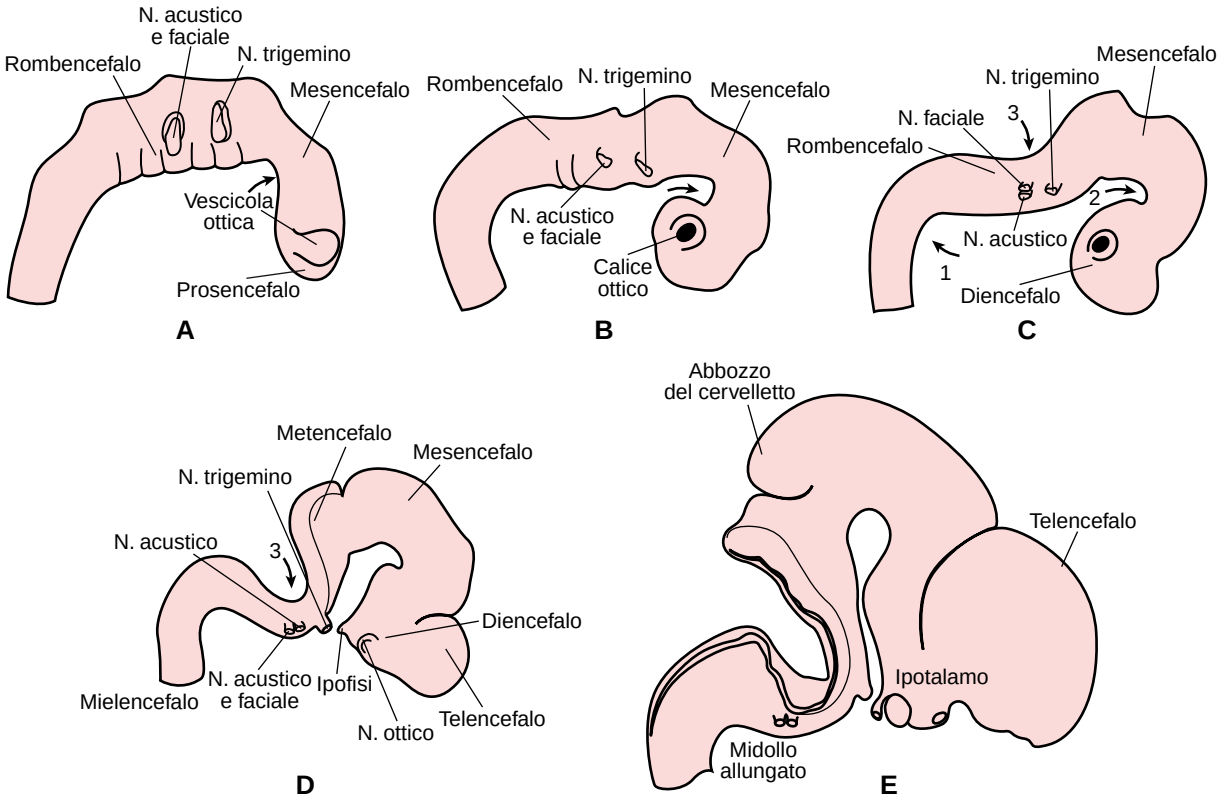



**Figura 13-12** ■ Illustrazioni di alcune fasi dello sviluppo dell'encefalo. *A)* Si osservano le tre vescicole primarie; nel prosencefalo compare la vescicola ottica; la freccia indica la flessura cefalica. *B)* La vescicola ottica evolve in calice ottico e rimane attaccata alla porzione del prosencefalo che darà origine al diencefalo; diventa più evidente anche la flessura cervicale tra rombencefalo e futuro midollo spinale. *C)* L'ulteriore accrescimento in lunghezza del tubo neurale determina la comparsa della flessura pontina (3) oltre alla cefalica (2) e cervicale (1). *D)* Il prosencefalo si suddivide in diencefalo e telencefalo mentre dalla suddivisione del rombencefalo originano il metencefalo e il mielencefalo. *E)* Il telencefalo prolifera formando le vescicole telencefaliche, futuri emisferi cerebrali; a livello del metencefalo inizia lo sviluppo del cervelletto. Il mielencefalo da origine al midollo allungato.

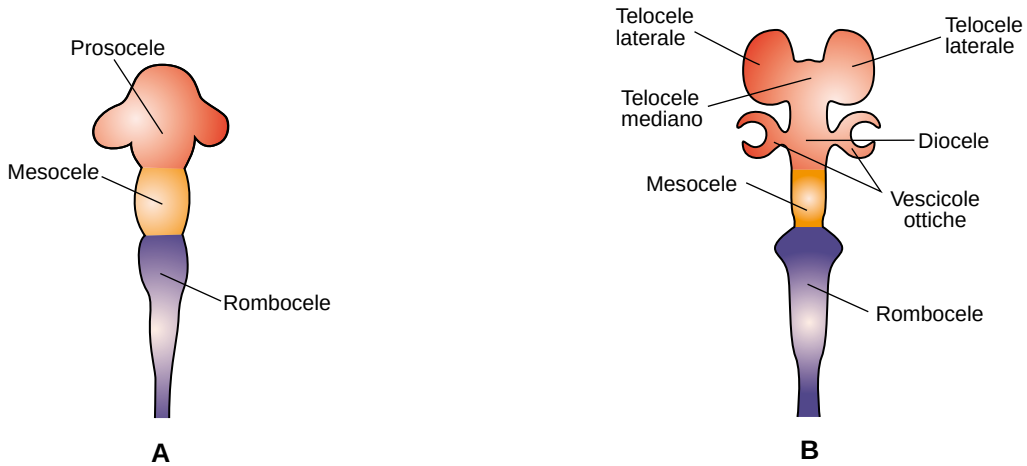



**Figura 13-13** ■ Rappresentazione schematica dell'evoluzione delle cavità delle vescicole encefaliche. *A)* Sono presenti prosocele, mesocele e rombocele all'interno rispettivamente del prosencefalo, mesencefalo e rombencefalo. *B)* Il prosocele si è modificato e si articola in teloceli laterali e telocele mediano all'interno del telencefalo, diocele all'interno del diencefalo. Il mesocele e il rombocele hanno subito modificazioni minori.

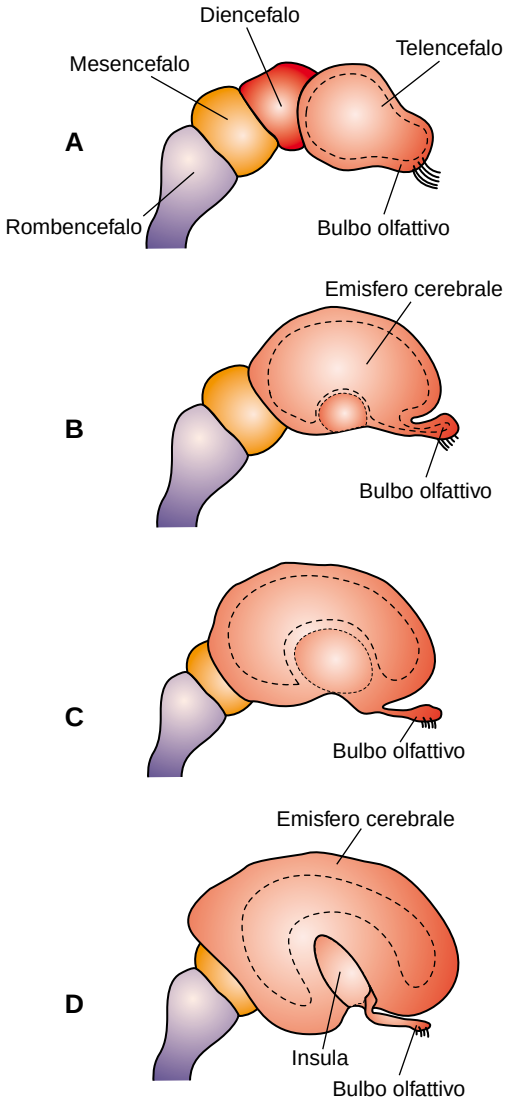



**Figura 13-14** ■ Disegni schematici delle fasi dello sviluppo del telencefalo. *A)* Compare il bulbo olfattivo. *B)* La vescicola telencefalica si accresce in maniera rilevante e ormai costituisce un emisfero cerebrale. *C)* L'emisfero cerebrale con la sua crescita nasconde il diencefalo. *D)* L'emisfero cerebrale comincia a presentare delle ripiegature della superficie che danno origine alle scissure e poi ai solchi per cui viene suddiviso in lobi; nel profondo della prima scissura laterale di Silvio si nota il lobo dell'insula.

Alla 7ª settimana, il telencefalo si è suddiviso nelle due vescicole telencefaliche e in ciascuna di esse compare un'ulteriore suddivisione che porta alla costituzione di nuove strutture, i **lobi olfattivi**, che in seguito andranno a far parte del **rinencefalo** (Fig. 13-14A). Anche i lobi olfattivi inizialmente contengono al loro interno delle cavità che però più tardi scompariranno. La comparsa dei lobi olfattivi segna l'inizio di una rapida crescita delle vescicole telencefaliche, che in breve tempo ricoprono gran parte delle strutture sottostanti e diventano

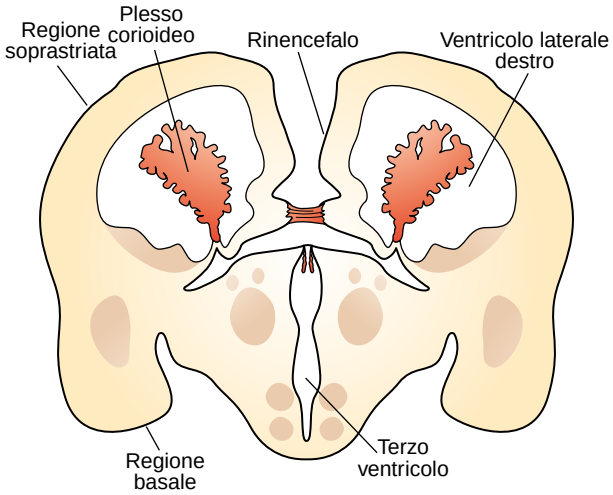



**Figura 13-15** ■ Sezione trasversale degli emisferi cerebrali. Si notino la regione basale o striata, il rinencefalo e la regione sopra striata.

la parte più superficiale del cervello, visibile dall'esterno (Fig. 13-14B). Al 3° mese dello sviluppo embrionale le vescicole telencefaliche hanno delle pareti lisce e si sono ulteriormente sviluppate sopra le strutture sottostanti (Fig. 13-14C); le vescicole telencefaliche sono ora identificabili come **emisferi cerebrali** (Fig. 13-14C,D).

Durante lo sviluppo in ciascun emisfero è possibile distinguere tre parti che acquisiranno funzioni diverse: la prima parte è il rinencefalo situato sulla superficie mediale dell'emisfero cerebrale. La seconda parte è l'**area striata** o **basale** caratterizzata da uno spessore maggiore di tessuto nervoso, all'interno del quale prenderanno origine i **gangli** o **nuclei basali**. La terza parte, la superficie laterale, è la **regione soprastriata** che diventerà la corteccia cerebrale e la relativa sostanza bianca adiacente (Fig. 13-15). Nell'uomo questa terza parte del telencefalo, detta soprastriata, diventa dominante ed è conosciuta come **neopallio** per la sua comparsa più recente nella filogenesi. Le parti corticali più antiche (allocortex) vengono invece chiamate **archipallio** e **paleopallio**. Da esse derivano rispettivamente la formazione dell'ippocampo e il lobo piriforme, che è parte del sistema olfattivo.

La superficie esterna degli emisferi è inizialmente liscia. Attorno al 4° mese la sostanza grigia esterna comincia ad accrescersi più rapidamente della sottostante sostanza bianca, con la conseguenza che la superficie della corteccia viene costretta a sollevarsi in pieghe (chiamate **circonvoluzioni** o, con termine latino, ***gyri***) separate da depressioni (dette **solchi** o **scissure**). La formazione delle circonvoluzioni permette alla corteccia cerebrale di aumentare considerevolmente la sua superficie mentre il volume complessivo del cervello rimane contenuto. La presenza dei solchi consente inoltre la suddivisione a fini descrittivi di ciascun emisfero in **lobi**: **lobo frontale**, **parietale**, **temporale**, **occipitale** e **dell'insula** (Fig. 13-1).

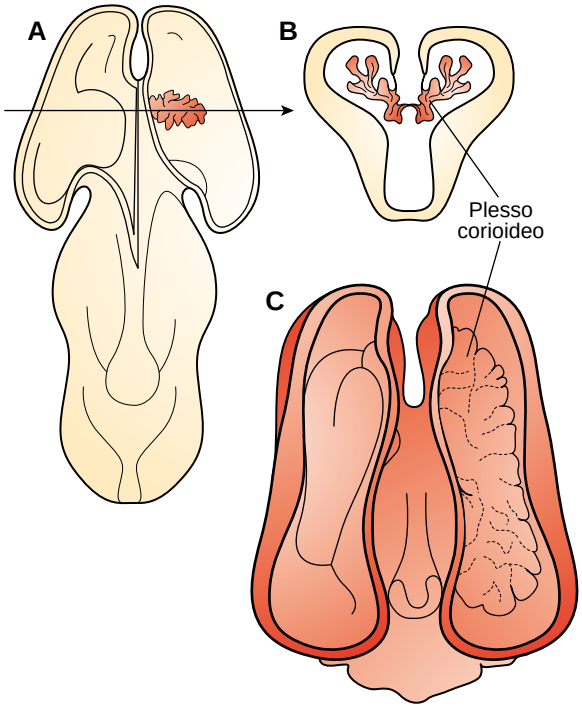



**Figura 13-16** ■ Schemi rappresentativi dello sviluppo dei plessi corioidei all'interno dei ventricoli laterali. *A)* Sezione frontale, *B)* sezione trasversale, *C)* visione dall'alto dopo sezioni degli emisferi a livello della linea in *A*.

I processi di proliferazione, migrazione e differenziamento delle cellule neuroepiteliali che sono i precursori della futura **corteccia cerebrale** sono del tutto particolari. Esse danno luogo a diverse progenie di neuroblasti che si distaccano dal neuroepitelio e migrano verso la periferia per formare i diversi strati della corteccia. È da notare che nella corteccia in formazione i neuroblasti migranti di nuova generazione superano ogni volta quelli formati in precedenza, stratificandosi sempre più all'esterno. Alla fine la corteccia cerebrale è formata da più strati di cellule, sei nella neocorteccia. I neuroni corticali emettono poi i loro prolungamenti che formano i circuiti neuronali stabilendo innumerevoli connessioni che devono essere ulteriormente perfezionate. Per questo, alla nascita, il sistema nervoso ha ancora un assetto rudimentale: il completo sviluppo si attuerà nell'infanzia e, relativamente ai circuiti implicati nelle funzioni cognitive superiori, fino alla pubertà. Lo strato neuroepiteliale rimasto più all'interno si differenzia in **cellule ependimali** mature che rivestono le cavità interne degli emisferi cerebrali. Queste ultime sono diventate i **ventricoli laterali**. Contemporaneamente il **III ventricolo,** originatosi dal telocele mediano posto al di sopra e dal diocele posto al di sotto (Fig. 13-17A,B), che inizialmente si presentava piuttosto ampio, si riduce, assottigliandosi e dando luogo ad una cavità mediana simile ad una fessura particolarmente ristretta nella sua porzione centrale (Fig. 13-15).

All'interno dei ventricoli si formano i **plessi corioidei** che risultano costituiti in parte dalle cellule ependimali che delimitano la superficie interna delle cavità dei ventricoli cerebrali e si evaginano accompagnate dalla pia madre (meninge più interna) adiacente e in parte dai vasi sanguigni della pia madre stessa, chiamati vasi corioidei: questo insieme (ependima, pia madre e relativi vasi) forma il plesso corioideo (Figg. 13-15 e 13-16), sede di produzione del **liquido cefalorachidiano**.

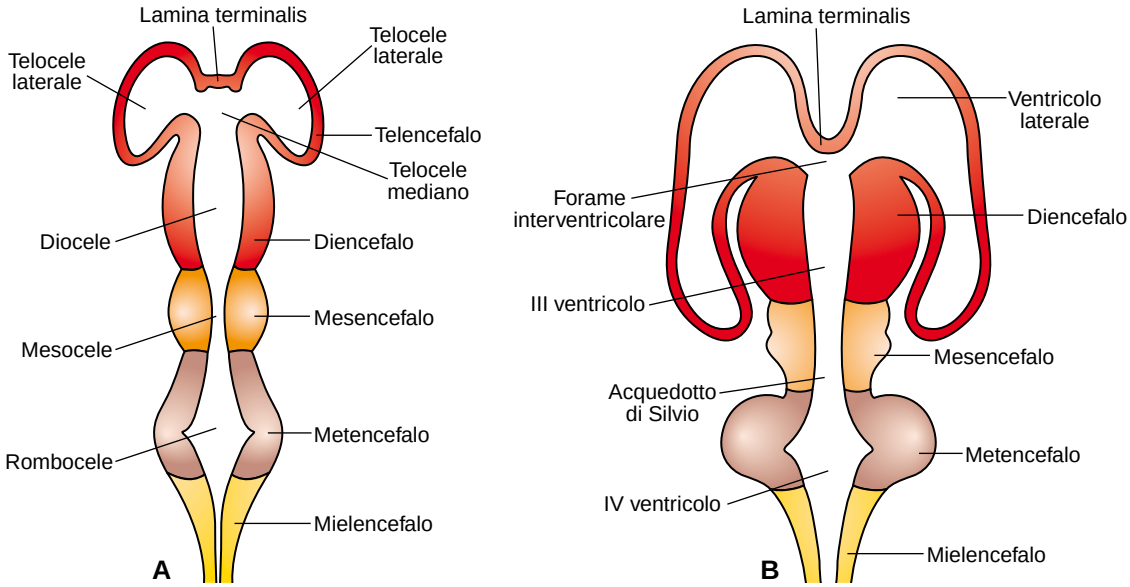



**Figura 13-17** ■ Rappresentazione schematica delle fasi dello sviluppo dei ventricoli cerebrali. *A)* Fase iniziale; *B)* le cavità iniziali contenute nelle vescicole hanno dato luogo alla formazione dei ventricoli cerebrali.

## Evoluzione del mesencefalo

La lamina alare del mesencefalo si sviluppa in strutture implicate nella elaborazione delle informazioni visive e uditive, i cosiddetti **collicoli** della **lamina quadrigemina**. La lamina basale dà origine ai neuroni dopaminergici della **substantia nigra** o **sostanza nera** e ai neuroni motori che formano i nuclei del III e IV paio di nervi encefalici, il **nervo oculomotore** e il **trocleare**. Queste porzioni che sono costituite da addensamenti di corpi cellulari delle cellule nervose si trovano immerse nella sostanza bianca formata dai prolungamenti nervosi rivestiti di guaina mielinica che sono particolarmente abbondanti nella parte ventrale del mesencefalo soprattutto in fasi più avanzate dello sviluppo quando vanno a costituire i due **peduncoli cerebrali**. Tali prolungamenti sono ascendenti e discendenti ossia mettono in comunicazione corteccia cerebrale e midollo spinale. La cavità del mesencefalo o cervello medio, il mesocele, diventerà l'**acquedotto cerebrale di Silvio** (Fig. 13-17).

## Evoluzione del rombencefalo e i rombomeri

Nello stesso tempo in cui il cervello anteriore si divide in telencefalo e diencefalo, il cervello posteriore o rombencefalo forma altre due strutture: il **metencefalo**, posto cranialmente, che costituirà il **ponte** nella sua porzione ventrale e il **cervelletto** dalla porzione dorsale; il **mielencefalo**, situato caudalmente, che diventerà il **midollo allungato**.

Nelle prime fasi di formazione del tubo neurale, la segmentazione che avviene nel neuroepitelio ha come conseguenza il fatto che la sua porzione, che diventerà il rombencefalo, presenta una serie di rigonfiamenti transitori disposti in successione ciascuno dei quali viene definito **rombomero** (Fig. 13-11). Nell'uomo sono presenti 8 rombomeri e ciascuno di essi sviluppa un proprio programma che porterà, nel complesso, alla formazione delle varie componenti del rombencefalo ovvero ponte, midollo allungato e cervelletto. Ogni rombomero infatti sviluppa una serie di strutture come nuclei (aggregati di neuroni), prolungamenti, gangli e nervi. Ciascun rombomero esprime una combinazione di fattori di trascrizione unica, controllata dal codice HOX (vedi "Processi e molecole"), cosicché ogni rombomero stabilisce un proprio dominio caratterizzato da peculiari e distinti segnali molecolari che risulta in un pattern di differenziazione neuronale rombomero specifico. Il risultato della differenziazione neuronale consente la formazione di diversi nuclei: alcuni di essi sono nuclei intercalati sulle vie nervose ascendenti e discendenti, altri sono nuclei che controllano funzioni viscerali come il ritmo degli atti respiratori oppure sono coinvolti nel ciclo sonno-veglia. Altri nuclei ancora contengono i neuroni da cui originano i prolungamenti dei nervi cranici quali il **nervo abducente**, il **nervo faciale**, il **nervo vestibolococleare**, il **nervo glossofaringeo**, il **nervo vago**, il **nervo accessorio** e il **nervo ipoglosso**. Alla fine del processo di formazione questi nuclei possono occupare il territorio di un solo rombomero o estendersi, grazie ad interazione tra i territori vicini, a più rombomeri, come ad esempio accade per il **nucleo vestibolare** che attraversa longitudinalmente tutti i rombomeri.

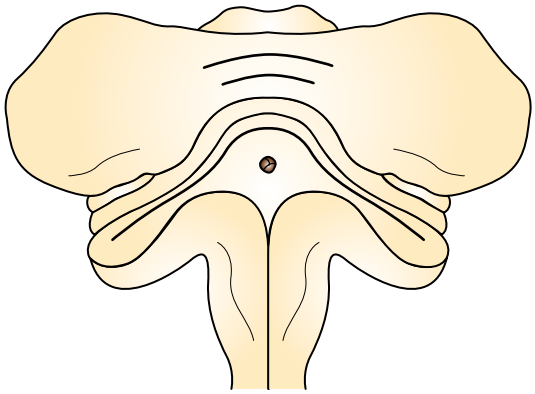


**Figura 13-18** ■ Visione della superficie dorsale del rombencefalo. Si nota più in alto il cervelletto che prolifera dalla parete. Al di sotto è evidente il forame di Magendie.

Una volta che il differenziamento all'interno dei singoli rombomeri ha portato il rombencefalo a dividersi ulteriormente in metencefalo e mielencefalo, la cavità del metencefalo, il **metacele**, insieme alla cavità del mielencefalo, il **mielocele**, darà origine al **IV ventricolo** che diventa proporzionalmente più piccolo, mantenendo nel contempo la sua forma originaria di aspetto romboidale. Durante il 3° mese sulla volta del IV ventricolo, a causa di una minima crescita dello spessore di tessuto nervoso, compare un'apertura mediana (**foro mediano del IV ventricolo** o **di Magendie**) seguita dalla formazione delle aperture laterali del IV ventricolo (**forami laterali** o **di Luschka**) (Fig. 13-18).

Contemporaneamente alla suddivisione del rombencefalo in metencefalo e mielencefalo, a seguito dell'ulteriore accrescimento in lunghezza del tubo neurale, compare una nuova terza flessura fra queste due strutture, a concavità dorsale: è la **flessura pontina** (Fig. 13-12C).

## Sviluppo del cervelletto

Lo sviluppo del cervelletto si protrae per un periodo piuttosto ampio che va dalla 4ª settimana di età gestazionale fino al 20° mese dopo la nascita. In un primo stadio il territorio cerebellare si definisce mediante un ispessimento della lamina alare a livello della giunzione tra cervello medio e il 1° rombomero, zona che viene definita **organizzatore istmico** in quanto esprime una serie di geni i cui prodotti sono critici per regolare lo sviluppo del futuro tronco encefalico e del cervelletto (Fig. 13-19).

In un primo momento le cellule del neuroepitelio nate in prossimità del IV ventricolo, migrano in due direzioni; la migrazione dorsale, che avviene tra l'8ª e la 13ª settimana del periodo gestazionale, porta alla formazione dei **nuclei cerebellari** in profondità e dello strato delle **cellule del Purkinje**. Successivamente si genera una seconda ondata di migrazione cellulare che procede ver-

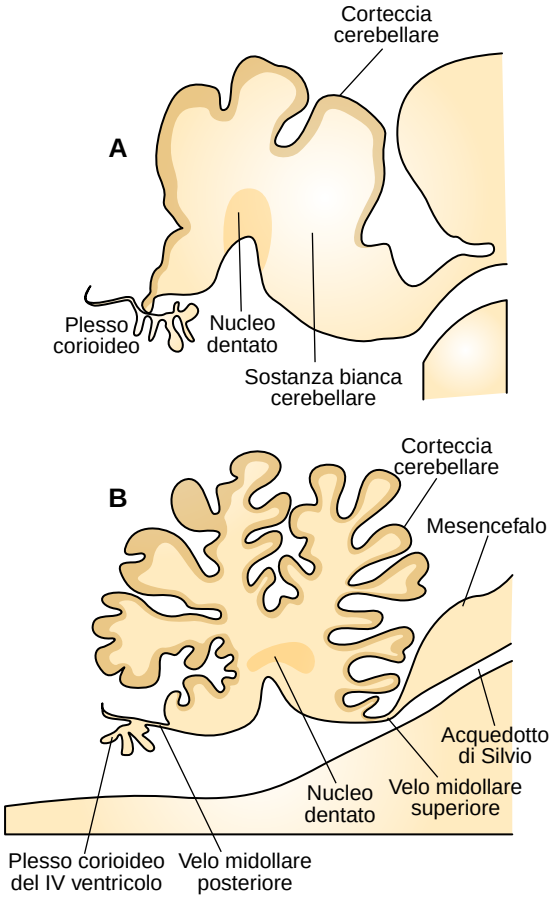



**Figura 13-19** ■ Rappresentazione schematica di alcune fasi dello sviluppo del cervelletto. *A)* La volta del rombencefalo prolifera per costituire il cervelletto. *B)* Nel cervelletto si costituisce la corteccia cerebellare, la sostanza bianca e alcuni nuclei di sostanza grigia situati in profondità tra i quali il nucleo dentato.

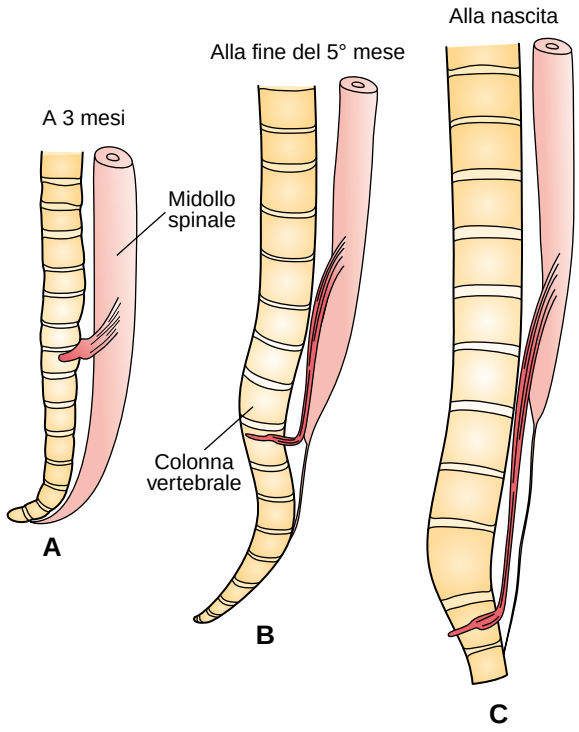



**Figura 13-20** ■ Variazione dei rapporti tra midollo spinale e colonna vertebrale durante lo sviluppo.

so la superficie del cervelletto in via di sviluppo e va a costituire lo **strato dei granuli esterno**. In un periodo ancora più tardivo queste cellule vanno incontro ad un'intensa proliferazione e successiva migrazione verso l'interno delle strutture cerebellari; la migrazione avviene lungo le fibre gliali radiali. Questa migrazione fa sì che le cellule migranti attraversino anche lo strato delle cellule del Purkinje e vadano a costituire lo **strato dei granuli interno**. Durante lo sviluppo che avviene nella vita postnatale lo strato dei granuli esterno gradualmente scompare. Si costituisce la corteccia cerebellare che così riveste perifericamente tutta la superficie esterna del cervelletto.

## Sviluppo del midollo spinale

Il midollo spinale deriva dalla porzione caudale del tubo neurale che, nelle prime fasi del suo sviluppo, si estende caudalmente fino alla punta coccigea della colonna vertebrale. Questa relazione fra l'estremità del midollo e la colonna vertebrale cambia successivamente a causa della diversa crescita del midollo rispetto alla colonna vertebrale in cui è contenuto; infatti alla nascita il midollo spinale termina a livello della seconda vertebra lombare come se fosse risalito all'interno del canale vertebrale stesso (Fig. 13-20).

Dal punto di vista istologico, lo sviluppo del midollo spinale può essere schematicamente diviso in 4 fasi successive: 1) formazione del canale dell'ependima, 2) formazione delle lamine alari e basali, 3) formazione della zona marginale e 4) sviluppo delle radici dorsale e ventrale. Le cellule che formano la parete del tubo neurale, vanno incontro ad un estensivo processo proliferativo e ciò porta a graduale riduzione della cavità del tubo, prima a formare una fessura a sezione losangica (romboidale) e successivamente a dar luogo ad un sottile tubicino che prende il nome di **canale dell'ependima** o **canale midollare centrale**. Questa regione rappresenta la zona più interna della parete del tubo neurale ed è costituita da un singolo strato di cellule cubico-cilindriche che delimitano il lume del canale centrale. Le cellule di questa regione costituiscono la **zona ventricolare** o **ependimale** (Fig. 13-21), da cui origineranno i neuroni e le cellule della macroglia del midollo spinale. In questa zona alcune cellule neuroepiteliali si differenziano in neuroblasti, i quali si portano più esternamente rispetto alla zona ependimale e formano la **zona mantellare** o **intermedia** che diventerà la **sostanza grigia** del midollo spinale. Più esternamente allo strato mantellare si organizza poi una

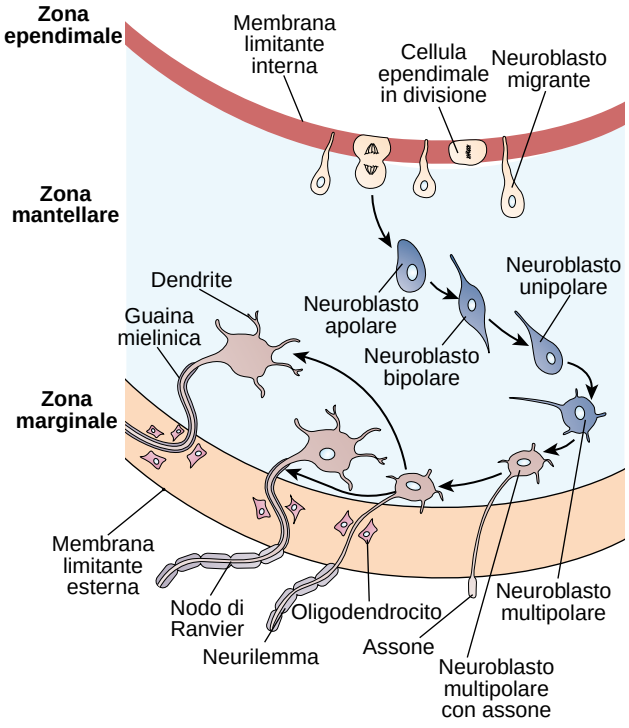



**Figura 13-21** ■ Schema che descrive l'evoluzione delle pareti del tubo neurale con conseguente formazione degli strati ependimale, mantellare e marginale.

regione priva di corpi cellulari e ricca di fibre nervose originate dalle cellule della zona mantellare, che viene chiamata **zona marginale** (Fig. 13-21).

Questa zona progressivamente si ispessisce (in seguito all'accrescimento degli assoni) e gradualmente si trasforma nella **sostanza bianca** del midollo spinale. Con il procedere dello sviluppo, la zona mantellare del midollo spinale presenta gli ispessimenti ventrali che hanno preso origine dalle **lamine basali** del tubo neurale, e gli ispessimenti dorsali derivati dalle **lamine alari**. I corpi cellulari derivati dalle lamine basali formeranno le **colonne ventrali**, **motrici** e costituiranno le **aree motorie** del midollo spinale; le cellule delle lamine alari formeranno gli **ispessimenti** (**colonne grigie**) **dorsali**, che costituiscono le aree sensoriali del midollo spinale (Fig. 13-3).

A poco a poco i neuroblasti vanno incontro alla trasformazione in neuroni maturi e, quando ciò è avvenuto, essi mostrano un'organizzazione dorso-ventrale precisa: i **neuroni sensitivi** si trovano nella parte dorsale mentre quelli **motori viscerali** e **somatici** sono localizzati nella parte ventrale; tra neuroni sensitivi e neuroni motori si trovano i **neuroni associativi di connessione** o **interneuroni**. I prolungamenti degli interneuroni rimangono all'interno del midollo spinale nella sostanza grigia, oppure fuoriescono nella sostanza bianca, precedentemente strato marginale, e collegano livelli diversi del midollo o cellule del midollo spinale con cellule dei centri che si trovano al di sopra del midollo stesso.

I prolungamenti che derivano dai neuroni di moto localizzati nelle colonne anteriori della sostanza grigia, fuoriescono dal midollo spinale e costituiscono le **radici motorie** o **anteriori dei nervi spinali** (Fig. 13-3).

L'istogenesi dei neuroni motori del midollo spinale (situati nelle colonne anteriori della sostanza grigia) e dei neuroni gangliari (vedi paragrafi precedenti) comporta la formazione di un **nervo spinale** che risulta quindi costituito da fascetti di prolungamenti periferici delle cellule sensitive gangliari che decorrono appaiati a fascetti di prolungamenti delle cellule di moto contenuti nelle colonne anteriori della sostanza grigia del midollo spinale (Fig. 13-3).

## Istogenesi del sistema nervoso

Come riportato sopra gli elementi cellulari propri del sistema nervoso si possono raggruppare in due categorie principali: neuroni e glia. Sia i neuroni che le cellule della glia, ad eccezione della microglia, derivano dal neuroectoderma (neuroepitelio) del tubo neurale e dalle creste neurali. Al contrario le cellule della microglia (cellule con attività simili ai macrofagi) hanno una derivazione embrionale incerta. L'opinione più accreditata è che durante il periodo embrionale le cellule di microglia originino dal mesenchima mesodermico che si infiltra nel tessuto nervoso in formazione. In seguito, a partire dal periodo fetale in poi, la microglia origina dai monociti del sangue. In particolare, nel sistema nervoso centrale troviamo quattro principali tipi cellulari: i neuroni, gli oligodendrociti, gli astrociti e le cellule ependimali. Tutti questi tipi cellulari derivano dal neuroepitelio del tubo neurale e sono generati durante lo sviluppo embrionale. Al contrario i neuroni gangliari, le cellule di Schwann e le cellule satelliti del sistema nervoso periferico derivano dalle creste neurali.

Mentre il tubo neurale prende forma e si organizza nelle vescicole encefaliche e nel futuro midollo spinale, con le stesse modalità già descritte per il midollo spinale, nella sua parete si sviluppano tre strati, lo **strato ependimale**, lo **strato marginale** e lo **strato mantellare**. Sebbene i rapporti tra **cellule neuroepiteliali**, **neuroblasti** e **cellule gliali radiali** non siano stati del tutto chiariti, specie nell'uomo, il modello che viene descritto di seguito che prevede tre fasi di proliferazione, neurogenesi e gliogenesi, è uno di quelli più accreditati (Fig. 13-22). Inizialmente, tra la 4ª e la 6ª settimana, le cellule del neuroepitelio che delimitano il lume del tubo neurale si dividono simmetricamente secondo piani perpendicolari alla membrana basale rimanendo quindi adese ad essa e allo stesso tempo differenziando in **cellule ependimali** e in cellule gliali radiali. Le cellule ependimali si allungano verso la periferia della parete del tubo neurale e si moltiplicano ripetutamente con divisioni simmetriche dirette anche queste secondo piani perpendicolari alla membrana basale; in questo modo mantengono una connessione con la superficie interna della parete. Le cellule radiali emettono dei lunghi prolungamenti che si estendono fino alla superficie del tubo neurale (**superficie piale**) (Fig. 13-22A). Successivamente, a partire dalla

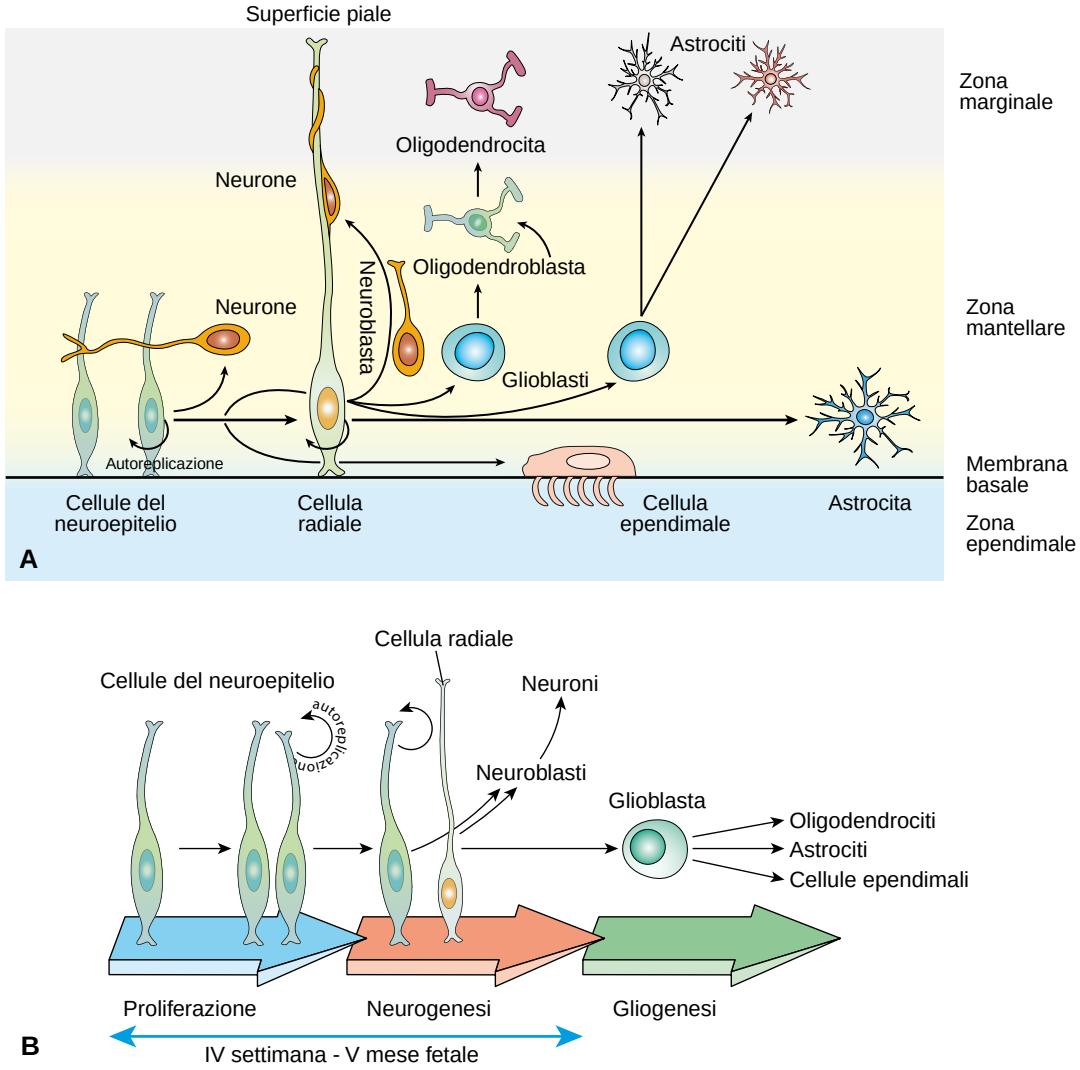



**Figura 13-22** ■ Schema del differenziamento del neuroepitelio. *A)* Inizialmente le cellule del neuroepitelio che delimitano il lume del tubo neurale auto replicano e differenziano in cellule ependimali o in cellule radiali. Le cellule radiali emettono dei lunghi prolungamenti che si estendono fino alla superficie del tubo neurale. Queste cellule, a seconda della regione, potranno poi differenziare in neuroni, oligodendrociti o astrociti. Dal neuroepitelio successivamente differenziano neuroni delle regioni ventricolari. *B)* Le tre fasi dell'istogenesi del tessuto nervoso.

fine della 4ª settimana, le cellule radiali cominciano a dividersi in modo asimmetrico, generando direttamente o attraverso dei precursori intermedi, oltre che nuove cellule radiali, anche neuroblasti. Il meccanismo molecolare alla base della divisione asimmetrica delle cellule radiali è basato sulla ripartizione asimmetrica della ciclina D2: la cellula che ne rimane priva cessa di dividersi e va incontro a differenziamento neuronale. Inoltre le divisioni mitotiche delle cellule gliali radiali sono ora dirette secondo piani paralleli alla membrana basale e non più perpendicolari. Si originano così neuroblasti che non hanno più rapporto con la superficie di impianto. I neuroblasti prima apolari e poi bipolari si spostano lungo i prolungamenti delle cellule radiali e si allontanano dallo strato ependimale verso lo strato più esterno, lo **strato mantellare**. A questo punto i prolungamenti dei neuroblasti dello strato mantellare si estendono ancora più perifericamente, così da formare una regione esterna priva di corpi di cellule nervose e costituita da un insieme di prolungamenti dei neuroblasti, lo **strato marginale**. In questo modo i neuroblasti differenziano progressivamente in neuroni. Questa organizzazione in tre strati (strato ependimale, strato marginale e strato mantellare) si attua inizialmente lungo tutta la parete del tubo neurale sia a livello delle vescicole cerebrali che del futuro midollo spinale. L'architettura a tre starti rimane quindi nel midollo spinale (vedi paragrafo precedente) e in varie regioni del cervello, ma nella corteccia cerebrale e cerebellare (cervelletto) avvengono ulteriori migrazioni cellulari che creano nuovi strati, fino ad un massimo di sei. Appena le cellule gliali radiali smettono di produrre neuroblasti a ritmi frenetici (è stata stimato una media

di 250.000 cellule al minuto!), cominciano a produrre un nuovo tipo di cellule i **glioblasti**, che dopo attiva proliferazione differenziano in astrociti e oligodendrociti. Oltre che dalle cellule radiali, i glioblasti e i neuroblasti (questi ultimi destinati a dare origine principalmente ai neuroni delle regioni ventricolari) possono originare direttamente dal neuroepitelio in una seconda fase in cui in esso le divisioni avvengono secondo piani paralleli alla membrana basale. Il periodo stimato di proliferazione del neuroepitelio e delle cellule radiali va all'incirca dalla 4ª settimana al quinto mese di vita fetale. Poiché i neuroblasti non si dividono, questo significa che la quasi totalità dei nostri neuroni si forma durante questo periodo. Le cellule della glia mantengono invece capacità mitotica anche nel tessuto nervoso di un adulto.

Nell'istogenesi del sistema nervoso risulta fondamentale il processo di migrazione dei neuroblasti e dei loro prolungamenti che permette la realizzazione dell'architettura di ciascuna stazione del sistema nervoso in relazione al programma genetico e a fattori che si trovano nel microambiente in cui le cellule sono accolte. I neuroblasti, prima di emettere i prolungamenti di tipo dendritico e assonico, migrano dalla sede nella quale sono stati generati e vanno a collocarsi in altri punti del sistema nervoso. Il processo di migrazione avviene lungo vie tracciate nelle fasi più precoci dello sviluppo del sistema nervoso e che, nella maggior parte dei casi, sono rappresentate dalle cellule gliali radiali. Queste infatti, essendo dotate di prolungamenti citoplasmatici che si estendono dalla zona ventricolare fino alla superficie dell'encefalo, consentono ai neuroblasti di migrare a distanze che possono raggiungere anche qualche centimetro. Una volta terminato il loro compito di guida dei neuroblasti, le cellule radiali sembrano progressivamente scomparire, differenziandosi in neuroblasti e astrociti o in alcuni speciali tipi di glia come le cellule di Bergmann del cervelletto e le cellule di Müller nella retina.

Una volta che un neuroblasto ha raggiunto la sua destinazione definitiva nelle strutture del sistema nervoso in formazione, comincia ad emettere prolungamenti di tipo dendritico e assonico. In un primo momento la formazione dei prolungamenti viene attuata in maniera sovrapponibile per le due tipologie che si distingueranno a maturazione completa. La cellula nervosa emette delle propaggini che costituiscono alla loro estremità il cosiddetto **cono di crescita**; questo assume l'aspetto di uno slargamento piuttosto irregolare, spesso con una terminazione a punta. All'interno del cono di crescita è presente un apparato citoscheletrico molto dinamico che in definitiva fornisce il motore per l'accrescimento in lunghezza del prolungamento. La membrana plasmatica del cono di crescita contiene numerose molecole e in particolare recettori che gli consentono di interagire con l'ambiente circostante (vedi Fig. 13-33 e relativa didascalia). Il cono di crescita dell'assone si distingue per una velocità di crescita maggiore di quella dei dendriti che può essere di circa 1 mm al giorno. La caratteristica del cono di crescita è quella di presentare, a sua volta, numerosi fini prolungamenti microscopici: **filopodi** e **lamellipodi**, che si irradiano in tutte le direzioni e che sono dotati di un continuo movimento; alcuni si allungano mentre altri si retraggono. Questi prolungamenti esplorano, in un certo senso, l'ambiente che li circonda nel quale possono trovare molecole e fattori che favoriscono il processo di allungamento oppure possono trovare ostacoli alla loro estensione. Si stabilisce un complesso di interazioni che, in conclusione, determina il raggiungimento del bersaglio finale da parte dei prolungamenti stessi; in questa maniera si svolge la formazione dei circuiti e delle vie nervose.

Il processo di migrazione cellulare e quello di crescita dell'assone si avvale in primo luogo di vie tracciate dalle strutture preesistenti; ad esempio i già citati prolungamenti delle cellule radiali, oppure i prolungamenti che già hanno progredito lungo un percorso rappresentano dei substrati utili perché diventano dei binari da percorrere per la crescita di nuovi prolungamenti. Infatti la membrana che riveste i prolungamenti che decorrono appaiati presenta numerose molecole, per lo più **molecole di adesione della superfamiglia Ig-like** (immunoglobulina simili), che permettono l'instaurarsi di interazioni reciproche tra la superficie dei coni di crescita e quella dei prolungamenti già presenti. Si tratta di glicoproteine che favoriscono l'adesione tra una cellula che le esprime ed altre cellule che a loro volta le esprimono, ossia creano le condizioni per un'adesione di tipo omofilico ovvero tra molecole identiche. Tra le più importanti classi di tali molecole si trovano la **N-CAM**, e le caderine calciodipendenti, come la **N-caderina**. I coni di crescita migrano anche nel contesto della matrice extracellulare esprimendo specifici recettori integrinici con i quali aderiscono in maniera dinamica con molecole della matrice come la **Laminina** e la **Fibronectina**.

## Le cellule delle creste neurali

La fusione delle pieghe neurali del solco neurale per formare il tubo neurale porta all'isolamento di un gruppo di cellule che costituirà le cellule delle **creste neurali** (NC), anche chiamate creste gangliari. La NC furono descritte per la prima volta nel 1868 da Wilhem His nell'embrione di pollo come le *Zwischenstrang*, o notocorda intermedia poiché essa appariva tra la notocorda e l'ectoderma. Le cellule della NC derivano dai margini laterali della placca neurale che divenendo poi pieghe neurali al momento della formazione della doccia neurale si fondono nella regione dorsale del tubo neurale in formazione. La NC inizialmente si presenta come una lamina unica che occupa la regione dorsale del tubo neurale, al di sotto dell'ectoderma dorsale (Fig. 13-9); successivamente la lamina si stacca dal tubo neurale e si bipartisce in due cordoni che si spostano nella regione dorso-mediale (ai lati) del tubo neurale, frammentandosi metamericamente in numerosi aggregati di cellule che iniziano a migrare verso diverse destinazioni (Fig. 13-23A). Le cellule delle NC sono dotate di molteplici potenzialità differenziative e di estese capacità migratorie. La migrazione di queste cellule implica una loro transizione epitelio mesenchimale per cui, una volta assunti i caratteri di cellule mesenchimali, esse si disperdono lungo vie migratorie

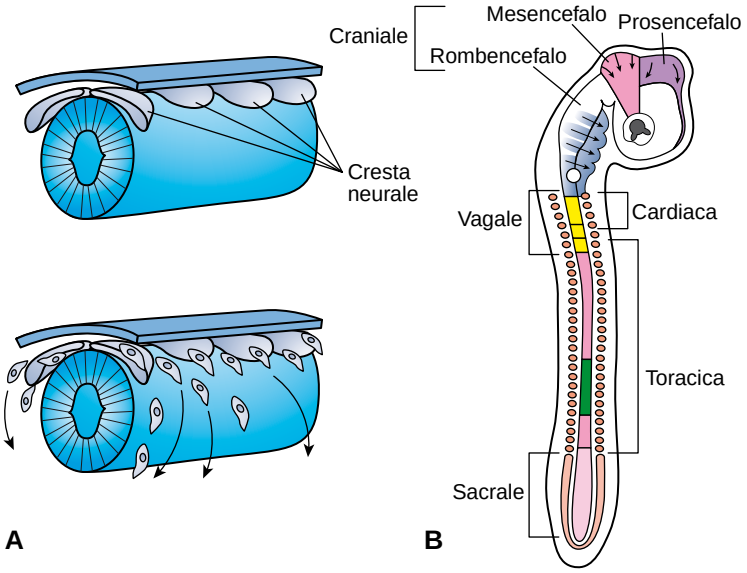



**Figura 13-23** ■ *A)* Transizione epitelio-mesenchima delle cellule delle creste neurali e loro migrazione in diverse regioni dell'embrione. *B)* Suddivisione delle cellule delle creste in funzione delle loro regioni di migrazione (regione craniale, cardiaca, toracica, vagale e sacrale).

specifiche e giungono nella loro posizione finale dove vanno incontro a differenziazione. Alcuni autori definiscono il mesenchima che origina dalle cellule della cresta neurale, **ectomesenchima**. Le cellule delle creste neurali vengono oggi considerate cellule staminali multipotenti capaci di autorinnovarsi che possono essere distinte dalle cellule del neuroepitelio oltre che per il loro potenziale differenziativo, grazie a diversi molecole di superficie, espressione genica e risposta a fattori di crescita. Per l'ampio numero di derivati le NC sono considerate da alcuni autori il **quarto foglietto embrionale**.

Il destino differenziativo delle cellule della NC non è quindi omogeneo, ma dipende dalla posizione delle stesse lungo l'asse dell'embrione. La NC può infatti essere divisa in quattro principali regioni lungo l'asse A-P, anche se le regioni non sono nettamente separate (Fig. 13-23B):

- la **cresta neurale craniale** o **cefalica**, le cui cellule danno origine ai gangli dei nervi craniali (neuroni e cellule satelliti), alle cellule di Schwann, ai melanociti e a parte del derma della faccia, ma anche a condroblasti, osteoblasti e cellule muscolari lisce essendo responsabili della formazione del mesenchima craniofacciale. Queste cellule, infatti, migrano in direzione dorso-laterale, negli archi (I e II) e nelle tasche faringee prima che il tubo neurale si chiuda. In questa sede, alcuni autori ritengono che possano dare origine anche alle **cellule C** (parafollicolari) della tiroide (vedi Capitolo 14);
- la **cresta neurale cardiaca**, subito al di sotto di quella craniale, le cui cellule migrano negli archi faringei dando origine a melanociti e condroblasti delle cartilagine del collo. Inoltre, danno origine alla parete muscolo-connettivale delle grandi arterie e contribuiscono alla formazione del setto tronco-conico che separa la circolazione polmonare dall'aorta (vedi Capitolo 17);
- la **cresta neurale toracica**, le cui cellule intraprendono due maggiori vie di migrazione: le cellule che danno origine ai melanociti migrano in direzione dorso-laterale nell'ectoderma, e continuano la migrazione lungo la linea mediale dell'addome; altre cellule, invece, migrano in direzione ventro-laterale lungo la metà anteriore di ogni sclerotomo. Alcune di queste restano nello sclerotomo e daranno origine ai gangli dorsali (neuroni e cellule satelliti), altre invece continuano la loro migrazione centralmente dando origine a cellule di Schwann, ai gangli simpatici, la midollare del surrene (cellule cromafini) e gruppi di neuroni che circondano l'aorta;
- la **cresta neurale vagale** (del collo) e **sacrale**, le cui cellule generano i gangli parasimpatici dell'intestino.

I principali derivati delle cellule della creste neurali sono riportati nella Figura 13-24.

## Formazione e sviluppo delle meningi

Le meningi sono un sistema di membrane di tessuto connettivo che rivestono il sistema nervoso centrale e proteggono l'encefalo e il midollo spinale (Fig. 13-25).

Le cellule che formano le meningi compaiono intorno alla 4ª settimana di sviluppo. Le meningi possono avere una derivazione sia ectodermica che mesodermica; le meningi che circondano il prosencefalo derivano dalle creste neurali, mentre le meningi che ricoprono il resto del cervello e del midollo spinale provengono dal mesoderma somatico (Fig. 13-25B). Molto poco si sa circa la regolazione dello sviluppo meningeo. È stato osservato che alterazioni nell'espressione del fattore di trascrizione **FOXC1** interferisce con la formazione delle meningi del prosencefalo. Studi successivi, mediante utilizzo di topi knock out, hanno suggerito un potenziale ruolo di questo fattore nel regolare la migrazione di cellule menin-

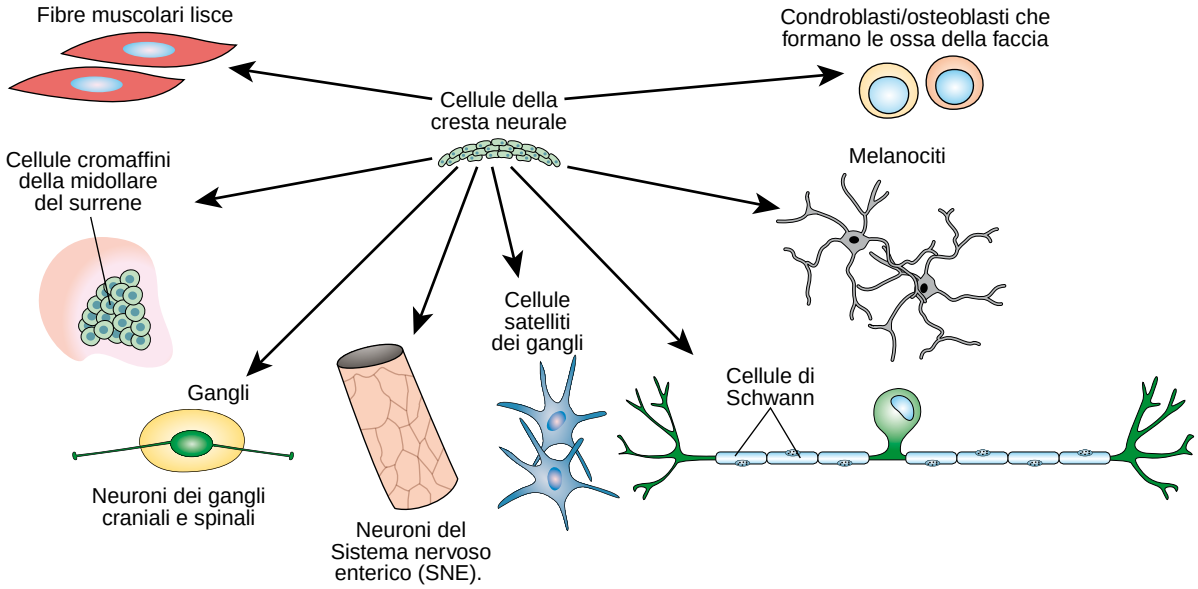



**Figura 13-24** ■ Principali derivati delle creste neurali.

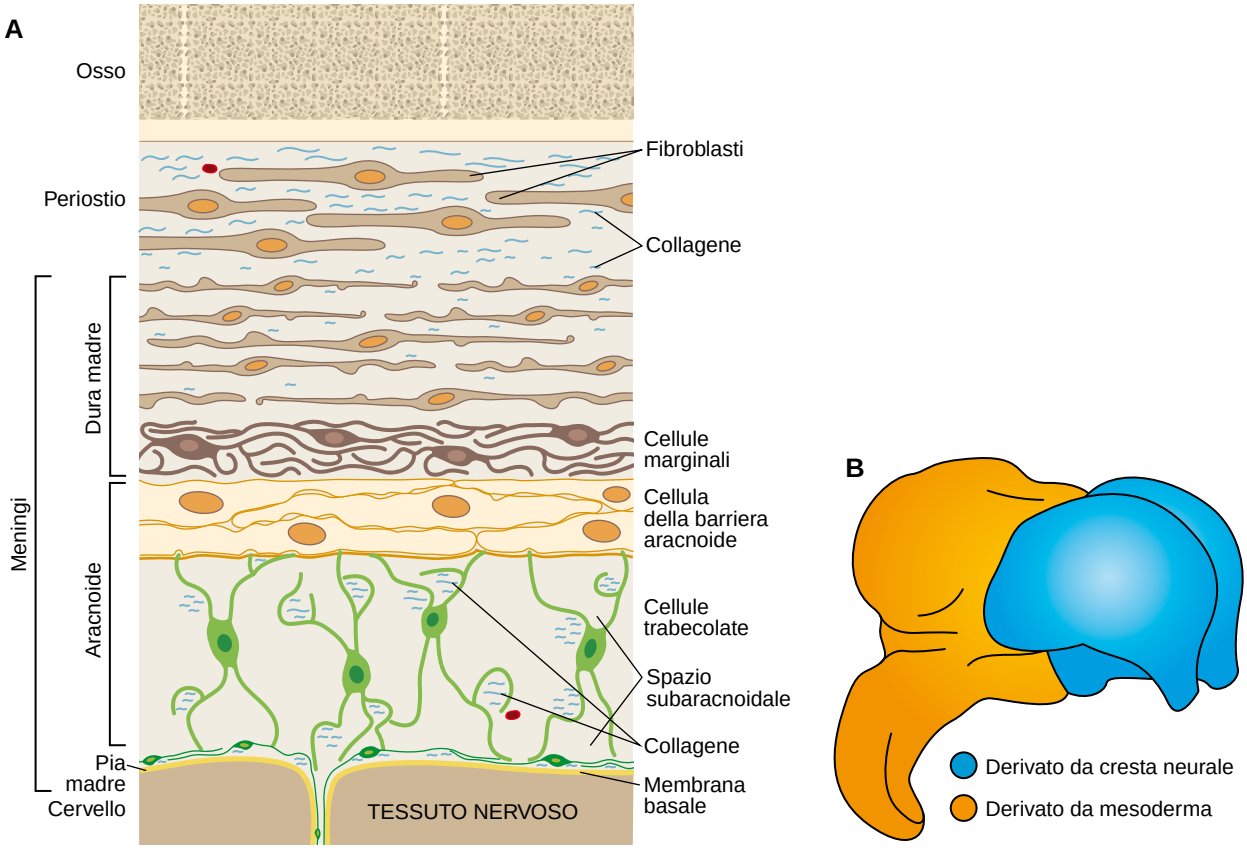



**Figura 13-25** ■ Origine e struttura delle meningi fetali. *A)* Schema dell'organizzazione delle meningi; nota che le cellule meningee piali e i vasi sanguigni sono in stretto contatto con la membrana basale piale, il punto di attacco per le terminazioni delle cellule radiali gliali. *B)* Le meningi che circondano il prosencefalo derivano dalle creste neurali (blu), mentre le meningi che ricoprono il resto del cervello e del midollo spinale provengono dal mesoderma somatico (giallo).

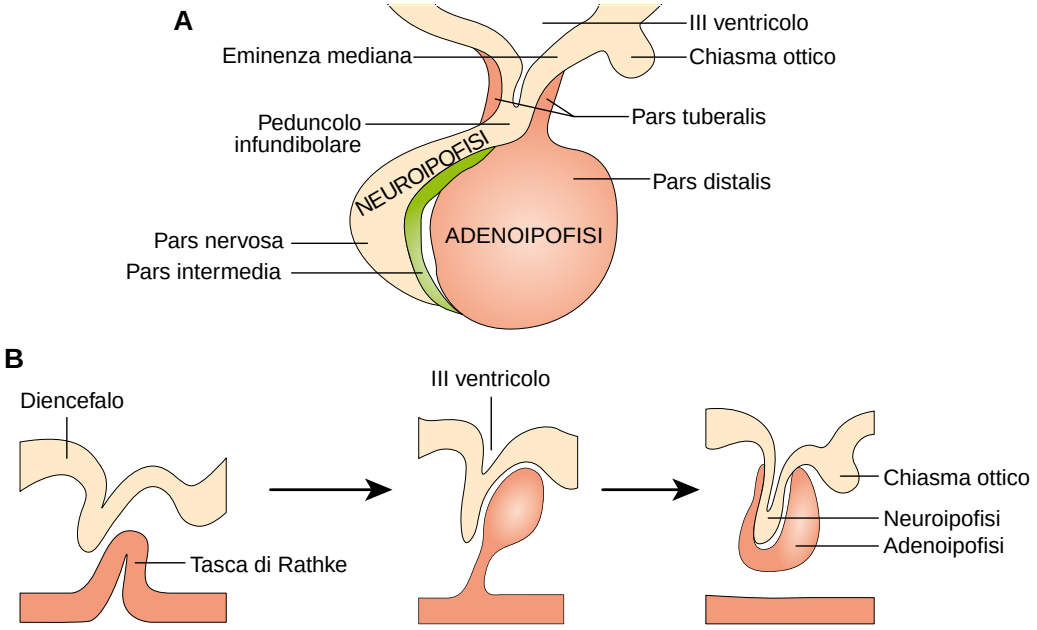



**Figura 13-26** ■ *A)* Disegno dell'ipofisi con le sue diverse regioni. *B)* Origine embrionale dell'ipofisi.

gee. Recenti evidenze sperimentali hanno anche chiarito che le meningi, oltre a svolgere un ruolo strutturale di sostegno e protezione, giocano un ruolo importante durante lo sviluppo del cervello. Attraverso il rilascio di fattori diffusibili, le meningi possono influenzare la proliferazione e la migrazione di progenitori neurali. Le cellule meningee, inoltre, secernono e organizzano la membrana basale della pia madre, dove aderiscono le cellule neuroepiteliali. Inoltre è stato dimostrato che le meningi costituiscono una nicchia che ospita cellule staminali sia nelle fasi dello sviluppo del sistema nervoso centrale sia nel cervello adulto.

## Sviluppo dell'ipofisi

L'ipofisi o ghiandola pituitaria è costituita da due lobi: un lobo anteriore, definito anche ipofisi anteriore o **adenoipofisi**, ed un lobo posteriore, noto anche come ipofisi posteriore o **neuroipofisi** (Fig. 13-26A). Sia l'adenoipofisi che la neuroipofisi possono essere suddivise in diverse regioni in base alle caratteristiche istologiche. L'adenoipofisi comprende: la pars distalis, la sezione più estesa, la pars tuberalis, un collare di tessuto che circonda il peduncolo infundibolare, la pars intermedia, una stretta fascia che di solito è separata dalla pars distalis da una fessura ipofisaria. La neuroipofisi comprende: la pars nervosa, la parte principale della ghiandola pituitaria posteriore, l'eminenza mediana, la sezione superiore della neuroipofisi sopra la pars tuberalis, il peduncolo infundibolare, il "gambo" che collega la pars nervosa alla base del cervello.

L'adenoipofisi si sviluppa da un'evaginazione ectodermica dello stomodeo immediatamente davanti alla membrana buccofaringea, nota come **tasca di Rathke**. La neuroipofisi prende invece origine da un'evaginazione (diverticolo) discendente del diencefalo che prende il nome di **processo infundibolare**. L'estremità inferiore di tale diverticolo darà origine alla neuroipofisi, mentre la porzione intermedia al peduncolo ipofisario (Fig. 13-26B). In particolare, una parte del pavimento del diencefalo si accresce caudalmente, formando la pars nervosa con il peduncolo infundibolare. Successivamente, la parete anteriore della tasca di Rathke si ispessisce formando la pars distalis, mentre la parete posteriore più sottile formerà la pars intermedia. La pars nervosa aderirà alla pars intermedia formando il lobo posteriore. La pars distalis con la pars tuberalis formerà il lobo anteriore. La tasca di Rathke è già visibile in un embrione di tre settimane e si presenta come un'evaginazione della cavità orale. Verso la fine del secondo mese di sviluppo, la tasca di Rathke perde la connessione con la cavità orale e si pone in stretto contatto con l'infundibolo.

## PROCESSI E MOLECOLE

### *Meccanismi molecolari dell'induzione del neuroectoderma e del differenziamento neuroni-glia*

L'induzione neurale rappresenta un formidabile esempio di come partendo da una struttura embrionale, l'ectoderma, si arrivi alla generazione di strutture diverse tra loro per organizzazione strutturale e funzionale, come il sistema nervoso e l'epidermide con i suoi annessi. Nel tentativo quindi di comprendere i principi che sottendono tale processo, è importante capire quando inizia l'induzione tissutale e qual è la sorgente cellulare e la natura molecolare dei segnali di tale induzione. È stato

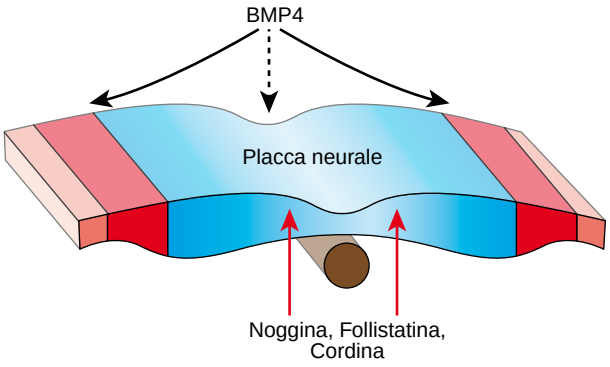



**Figura 13-27** ■ Principali fattori di crescita che determina la formazione della placca neurale. Cordina, noggina e follistatina prodotti dalla notocorda inibiscono la segnalazione di BMP4 che induce nell'ectoderma differenziamento in senso epidermico. Tale inibizione induce l'ectoderma verso il differenziamento in neuroectoderma.

osservato che le cellule neuroepiteliali del neuroectoderma si formano da cellule ectodermiche che "evitano" una varietà di segnali istruttivi, tra cui importanti quelli delle proteine **BMP**, che al contrario inducono nell'ectoderma il differenziamento epidermico. Difatti, mentre il nodo di Hensen e probabilmente altri tessuti limitrofi producono BMP4 che perfonde nell'ectoderma, la notocorda secerne proteine come la **Cordina**, la **Follistatina** e la **Noggina** che inibiscono l'azione di questo fattore di crescita (Fig. 13-27). Ciononostante le proteine BMP non sono completamente escluse dal differenziamento cellulare neuronale. Una volta formato il tubo neurale, quello che le cellule neuroepiteliali evitavano nelle prime fasi di induzione, diventa necessario per il successivo programma differenziativo neuronale. Infatti è stato dimostrato che i fattori BMP vengono secreti dalle cellule della regione dorsale del tubo neurale e giocano un ruolo chiave nella specificazione e differenziamento degli interneuroni dorsali, come verrà discusso più avanti. Come descritto nei precedenti paragrafi, le cellule neuroepiteliali, all'interno del tubo neurale, danno origine a diversi tipi di cellule nervose, producendo prima le cellule ependimali e le cellule radiali gliali e poi i neuroblasti e i glioblasti. Lo studio dei meccanismi molecolari che dirigono le cellule radiali a differenziarsi in neuroblasti ha portato all'identificazione del fattore di trascrizione **PAX-6** (paired box-6) come proteina chiave di questo processo differenziativo. Durante la neurogenesi i neuroni sono prodotti anche da quasi tutte le regioni del neuroepitelio, ad eccezione di poche aree specializzate, come il chiasma ottico. Il differenziamento tra neuroni e glia, a partire dal neuroepitelio, è regolato da segnali induttivi e dall'attivazione di specifici fattori trascrizionali, che dirigono e orchestrano un programma di espressione genica cellula-specifica. Si è così dimostrato nei roditori che i fattori di trascrizione **bHLH** attivatori (basic helix group helix) hanno un ruolo chiave nell'indirizzare i precursori neurali verso il differenziamento neuronale piuttosto che gliale. Fattori bHLH attivatori come MASH1 (mouse achaete-scute complex homolog 1), MASH2, MATH3 (mouse atonal homolog3), Neurogenina e altri, indotti da BMP4 e SHH (Sonic hed-

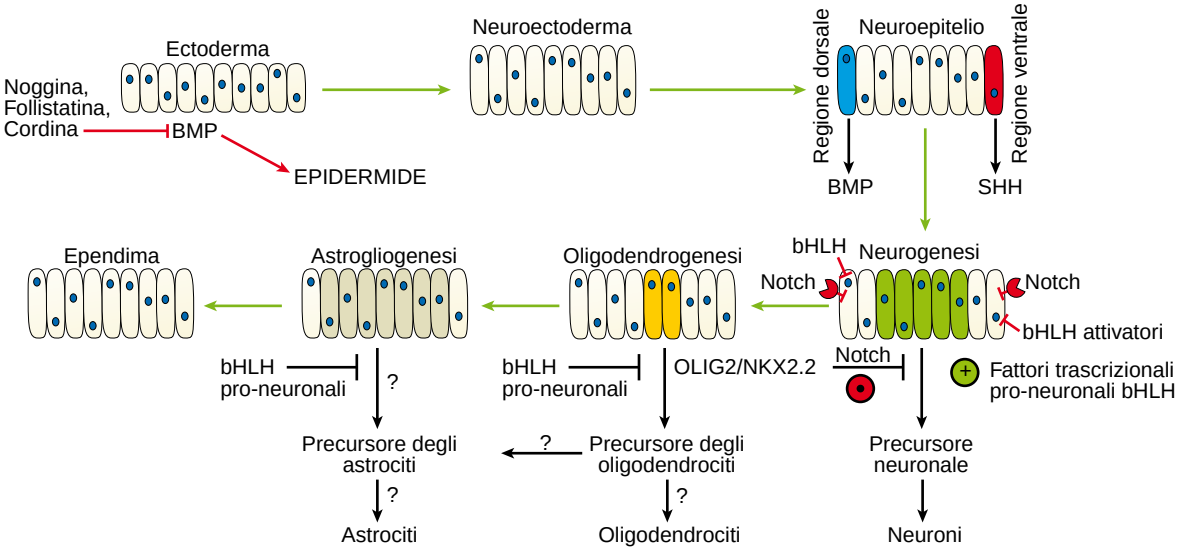



**Figura 13-28** ■ Rappresentazione schematica dell'origine embrionale dei progenitori neuronali e gliali dal neuroepitelio nel corso dello sviluppo del sistema nervoso centrale e alcuni dei fattori che ne promuovono il differenziamento. In particolare dopo l'induzione del neuroectoderma da parte di inibitori di BMP, i fattori neurogenici bHLH indirizzano i precursori neuronali indotti da BMP e SHH verso il differenziamento neuronale. L'inibizione di tali fattori da parte della segnalazione di Notch e di bHLH repressori assicura l'automantenimento di alcune cellule del neuroepitelio e il loro successivo differenziamento in cellule gliali stimolato da OLIG2 e NKX2.2.

geog) inducono da una parte l'attivazione di geni che dirigono il differenziamento del neuroepitelio in neuroblasti e neuroni, dall'altra causano la secrezione da parte dei neuroblasti differenzianti di fattori che attivano i recettori di **Notch** espressi dal neuroepitelio. La segnalazione intracellulare attivata da Notch, coadiuvata all'espressione di fattori bHLH inibitori è fondamentale per mantenere le cellule neuroepiteliali limitrofe proliferanti e indifferenziate e consentire ad altri fattori di crescita quali **FGF2**, **CNTF** (ciliary neurotrophic factor) e **BMP** di indurre queste cellule neuroepiteliali a differenziare in cellule gliali a seguito dell'espressione dei fattori di trascrizione **OLIG2** (oligodendrocyte transcription factor 2) e **NKX2-2** (NK2 homeobox 2) (Fig. 13-28).

## *Formazione e chiusura della doccia e formazione del tubo neurale*

I processi di formazione e chiusura, adesione e fusione dei lembi della doccia neurale che portano alla formazione della pelle sul dorso dell'embrione e del neuroepitelio della volta del tubo neurale sono poco conosciuti dal punto di vista molecolare. È noto tuttavia che essi sono guidati da una serie di **processi intrinseci** ed **estrinseci** al neuro ectoderma. I processi intrinseci includono cambiamenti di forma e movimenti delle cellule dovuti a modificazioni del loro citoscheletro e proliferazione delle cellule indotta da fattori di crescita. I ripiegamenti che portano alla formazione del tubo neurale coinvolgono l'instaurasi di **linee di ripiegamento a cerniera**, una mediana e due dorso-laterali. A livello di queste le cellule cambiano la loro forma da cilindrica allungata a cubica a cuneo e aderiscono fortemente a strutture adiacenti depositando matrice extracellulare (vedi anche Capitolo 2). A livello della cerniera mediana le cellule aderiscono alla notocorda, mentre le cerniere dorso-laterali aderiscono alle pieghe ectodermiche. Forze meccaniche estrinseche generate dal mesoderma e dall'ectoderma circostanti spingono le pareti del tubo neurale che si piegano in corrispondenza delle cerniere (Fig. 13-29).

Nel momento in cui i lembi della doccia neurale si avvicinano tra di loro, alcune protrusioni cellulari si espandono dalle cellule apicali e si interdigitano per dare poi origine a contatti permanenti. Nel topo sono stati implicati nel processo di fusione i **recettori Efrina-A5/A7,** le molecole adesive **N-CAM** e **N-caderina** prodotte entrambe dalle cellule del neuroepitelio e la **E-caderina** prodotta dal sovrastante ectoderma. La chiusura del tubo neurale procede bidirezionalmente in una maniera che ricorda la chiusura di una cerniera lampo. Studi nel topo hanno dimostrato la presenza di più siti di inizio della chiusura del tubo. Il primo sito è al confine tra cervello posteriore e tratto cervicale e poi procede rostralmente verso il futuro cervello e caudalmente verso la regione spinale. Il secondo sito di chiusura inizia al confine tra cervello anteriore e cervello medio e il terzo sito è localizzato all'estremità rostrale del cervello anteriore. Anche nell'uomo si è dimostrata la presenza di diversi siti iniziali di chiusura, ma non è stato ancora chiarito il loro numero e la loro sede.

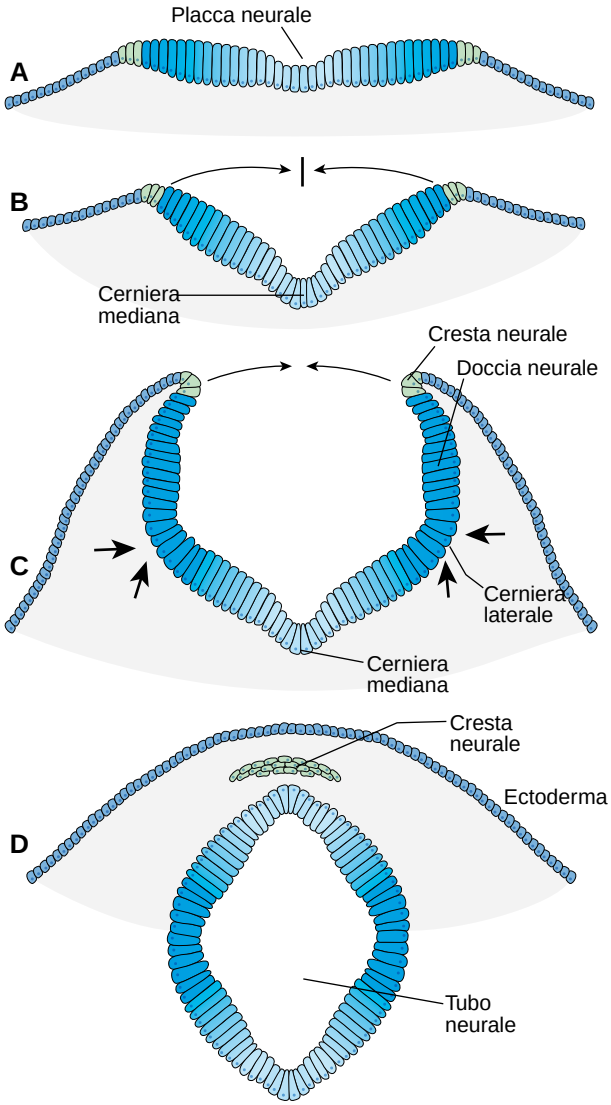



**Figura 13-29** ■ Processi morfogenici intrinseci ed estrinseci che determinano la progressiva trasformazione della doccia neurale in tubo neurale.

Nella ripiegatura e chiusura del tubo neurale viene assegnato un ruolo sempre più importante ai cosiddetti **fattori della polarità cellulare.** Si tratta di vie di segnalazioni molecolari che instaurano processi per cui le cellule diventano polarizzate e cambiano di forma come per esempio la modificazione sopra descritta da cilindrica allungata a cubica a cuneo. Gli studi su questi segnali sono stati condotti soprattutto in drosofila. Vengono indicati come i geni ***Pcp*** (planar cell polarity), che comprendono geni come *Frizzled* (Fz), *Dishevelled* (Dsh/Dvl), *Strabismus/Van Gogh* (Stbm/Vang), *Flamingo* (Fmi), *Prickle* (Pk) e *Diego* (Dgo), che vengono attivati da questi fattori. Le proteine codificate da questi geni formano un complesso associato alla membrana e, a tale livello, diventa cruciale la loro quantità e la loro distribuzione. Il segnale è attivato grazie al legame di un ligando

sconosciuto al **recettore FZ** (**Frizzled**), dopodiché queste proteine vanno incontro a una redistribuzione asimmetrica che genera la polarità cellulare.

## *Determinazione delle regioni antero-posteriori e dorso-ventrale del tubo neurale*

Come descritto nei paragrafi precedenti, durante lo sviluppo embrionale, lungo il tubo neurale, si differenziano regioni diverse del sistema nervoso centrale caratterizzate da una diversa distribuzione di popolazioni di neuroni lungo gli assi antero-posteriore (A-P) e dorso-ventrale (D-V). Ma come vengono generate queste popolazioni neuronali al momento giusto nel posto giusto? Come si origina un sistema così complesso? Oltre ai fattori discussi in precedenti capitoli che alla gastrulazione determinano il piano generale degli assi A-P e D-V (AVE, nodo, linea primitiva, notocorda), un ruolo chiave nell'indurre le diverse regioni del tubo neurale in direzione A-P è svolto dai **geni *Hox***. Come spiegato nel Capitolo 11, le combinazioni di espressione dei geni Hox, il cosiddetto "codice dei geni Hox", determina la posizione degli organi nel corpo e quindi, nel caso del tubo neurale, delle diverse regioni del sistema nervoso neurale. L'attivazione dei geni Hox che controllano la regionalizzazione del sistema nervoso è regolata principalmente e in modo antagonistico dall'**acido retinoico** (RA) e dagli **FGF**. Altri fattori partecipano sicuramente a questo processo, ma non sono stati ancora identificati. La strutture della regione anteriore del tubo neurale (cervello anteriore e mediano) sono determinate però da un'altra famiglia di geni omeotici diversa dagli Hox, i geni ***Otx*** (orthodenticle homeobox) e ***Emx*** (empty spiracle homeobox) che pure codificano per fattori di trascrizione. L'attivazione di questi geni avviene a seguito di fattori non ancora identificati, ma che con ogni probabilità sono prodotti dall'AVE (Fig. 13-30).

In sostanza, per la costituzione del sistema nervoso lo sviluppo in una determinata regione del tubo neurale implica il differenziamento in quella stessa regione di specifiche popolazioni di neuroni. Oltre che lungo l'asse A-P, popolazioni diverse di neuroni si posizionano in direzione D-V, con i neuroni motori generalmente in posizione ventrale e gli interneuroni e i neuroni sensitivi in posizione dorsale. Questa seconda distribuzione spaziale (D-V) è regolata, oltre che dai geni Hox, in maggior misura da gradienti di fattori di crescita quali **WNT**, **BMP** e **SHH** e dell'**RA** che stimolano o reprimono l'espressione di diversi fattori di trascrizione tra cui importanti **PAX** e **IRX** (iroquois homeodomain).

Per brevità e per meglio comprendere l'azione induttiva/repressiva di un determinato fattore prenderemo in considerazione il differenziamento dei motoneuroni e degli interneuroni dorsali, i quali originano da due distinte regioni del tubo neurale: rispettivamente la regione ventrale e la regione dorsale. Diversi fattori di secrezione stabiliscono, con un andamento dorso-ventrale, dei "domini" differenziativi, regolando l'espressione spaziale e temporale di specifici fattori di trascrizione.

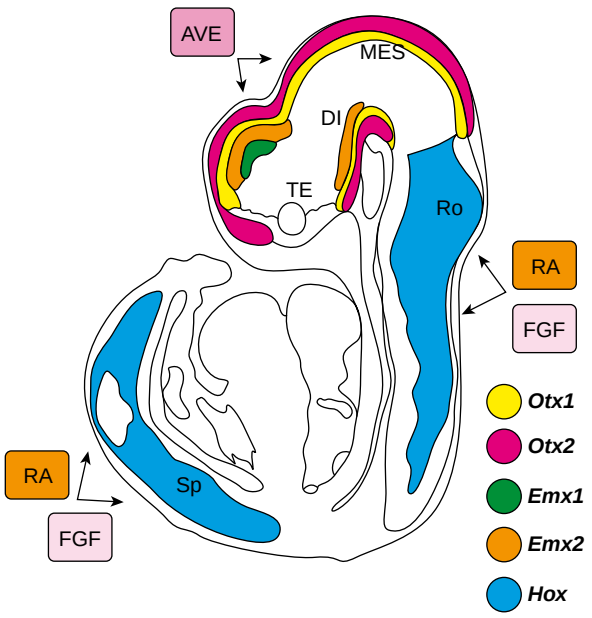



**Figura 13-30** ■ Schema dei geni omeotici che determinano le regioni del tubo neurale secondo l'asse A-P nel topo. TE = telencefalo; DI = diencefalo; ME = mesencefalo; Ro = romboencefalo; Sp = midollo spinale.

Tra i numerosi fattori coinvolti, quelli che hanno un ruolo chiave nel determinare questo andamento differenziale di espressione genica sono: **SHH** secreto dalla notocorda e dalla regione ventrale del tubo neurale, l'**RA** prodotto dai somiti che fiancheggiano il tubo neurale e fattori **WNT** e **BMP** prodotti a livello della regione dorsale del tubo neurale (Fig. 13-30). L'attività di SHH è fondamentale per la specificazione e il differenziamento dei neuroni motori nelle regione ventrale del tubo neurale, attraverso la combinata induzione e repressione di diversi fattori di trascrizione. In particolare SHH reprime l'espressione dei fattori di trascrizione **PAX7**, **PAX6** e **IRX3** (iroquois homeodomain 3), mentre induce l'espressione di altri fattori trascrizionali quali **DBX1** (developing brain homeobox protein 1), **DBX2**, **NKX6.1**, **OLIG2**, **FOXA2** (forkhead boxprotein A2). A seguito della diversa combinazione di espressione di questi fattori di trascrizione lungo l'asse dorso-ventrale i neuroblasti intraprendono destini differenziativi diversi (Fig. 13-31).

Le evidenze sopra riportate dimostrano come SHH rappresenti un fattore chiave nella specificazione dei motoneuroni; ma come i diversi tipi di motoneuroni vengono specificati in direzione A-P? Tra i motoneuroni esistono quelli che innervano i muscoli assiali che supportano la postura (median motor column, MMC), i neuroni motori ipoassiali (hypomor column, HMC) che innervano i muscoli del corpo vicino la gabbia toracica, i neuroni motori pregangliari (pre-gangliar column, PGC) che innervano i gangli periferici del sistema nervoso autonomo e i neuroni motori laterali (late-

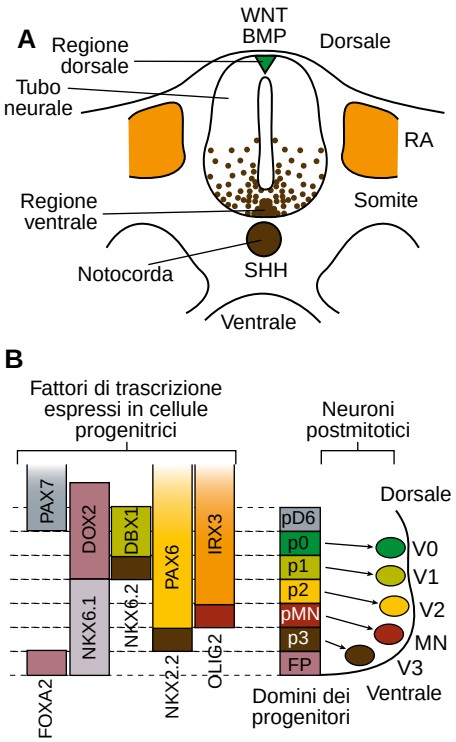



**Figura 13-31** ■ *A)* Rappresentazione schematica di una sezione trasversale del midollo spinale in formazione e di strutture limitrofe. Diversi neuroni, funzionalmente distinti, vengono generati all'interno del midollo spinale in risposta ai segnali emanati dall'interno del tubo neurale e dai tessuti circostanti. I segnali con un ruolo chiave nella neurogenesi includono SHH (marrone), secreto dalla notocorda e dalla regione ventrale (floor plate) del tubo neurale; acido retinoico (RA, arancione), prodotto dai somiti che fiancheggiano il tubo neurale; membri della famiglia BMP e WNT (verde) prodotti dalla regione dorsale del tuo neurale. La diffusione di SHH stabilisce un gradiente di attività nella regione ventrale del tubo neurale (puntini marroni). *B)* Rappresentazione schematica della regione ventrale del tubo neurale, dove il gradiente di SHH controlla l'identità posizionale attraverso la regolazione dell'espressione, nei progenitori neurali, di diversi fattori di trascrizione. Questi includono PAX7, PAX6 e IRX3 che sono repressi dalla segnalazione di SHH, e DBX1, DBX2, OLIG2, NKX2.2, NKX6.1/6.2 e FOXA2, attivati da SHH. L'espressione combinatoria di questi fattori di trascrizione definisce i domini dei progenitori (p). Dal polo ventrale FP (floor plate) questi ultimi sono chiamati p3, pMN, p2-p0 e pD6. Ciascun dominio progenitore è identificato dal suo codice trascrizionale, codice che ne determina la progenie. Ciascun dominio progenitore genera differenti sottotipi di interneuroni ventrali (V0-V3) o motoneuroni (MN).

ral motor column, LMC) che innervano i muscoli delle braccia e delle gambe. Come sopra anticipato sono i fattori di trascrizione codificati dai geni *Hox*, *Otx* e *Emx*, ad operare in una rete di segnali incrociati particolarmente sofisticata per specificare i diversi sottotipi di neuroni motori nelle diverse regioni del sistema nervoso. Il fattore di trascrizione HOX6 per esempio contribuisce alla specificazione di neuroni motori brachiali LMC, HOX9 specifica i neuroni PGC e HOX10 i neuroni motori lombari LMC.

## Meccanismi molecolari coinvolti nell'induzione e mantenimento della polarità neuronale

La specificazione dei dendriti e dell'assone è un evento critico nello sviluppo di un neurone e rappresenta la base della polarità neuronale, secondo cui i dendriti di solito ricevono i segnali, mentre l'assone invia tali segnali sotto forma di impulso nervoso. Studi recenti hanno contribuito a definire il potenziale meccanismo molecolare dell'induzione e mantenimento della polarità neuronale, rivelando il ruolo critico di una chinasi, la **glicogeno sintasi chinasi-3beta** (GSK-3β). Utilizzando dei sistemi di colture in vitro di neuroni dell'ippocampo, è stato osservato che la forma fosforilata, quindi inattiva, di GSK-3β è particolarmente espressa a livello del prolungamento assonico rispetto ai dendriti, suggerendo un suo potenziale coinvolgimento nell'instaurarsi della polarità neuronale. Tale ipotesi è stata validata mediante uso di mutanti: una forzata espressione di una forma mutante sempre attiva di GSK-3β nelle fasi iniziali del differenziamento neuronale comporta un blocco nell'instaurarsi della polarità neuronale ed in particolare determina un'inibizione nello sviluppo dell'assone, mentre l'inibizione farmacologica di GSK-3β porta alla formazione di neuroni con assoni multipli (Fig. 13-32).

È interessante notare che non solo GSK-3β è essenziale per l'induzione della polarità neuronale, ma svolge un ruolo critico anche nel mantenimento della polarità stessa. Infatti, è stato osservato che l'inibizione di GSK-3β in neuroni maturi determina la conversione dei dendriti esistenti in assoni funzionali, capaci cioè di condurre l'impulso nervoso verso il bottone sinaptico.

Questi studi, aprono prospettive nuove anche in campo terapeutico. Gli attuali approcci per promuovere il recupero della connettività in seguito a lesioni neurali mirano a rigenerare gli assoni danneggiati o a facilitare la gemmazione degli stessi. La capacità di convertire i dendriti in assoni suggerisce che potrebbe essere possibile riprogrammare dei dendriti a diventare assoni, favorendo un recupero morfo-funzionale più veloce dopo un danno neurale.

## Molecole direzionali del cono di crescita dell'assone

Un processo fondamentale nel differenziamento dei neuroni è lo stabilirsi di complesse reti di comunicazione basate su contatti sinaptici modulabili. Inoltre altri neuroni devono andare a formare contatti sinaptici con cellule muscolari e cellule ghiandolari situate anche a notevoli distanze. Per realizzare queste strutture, gli assoni seguono dei percorsi che richiedono una serie di segnalazioni direzionali. Negli ultimi anni sono state

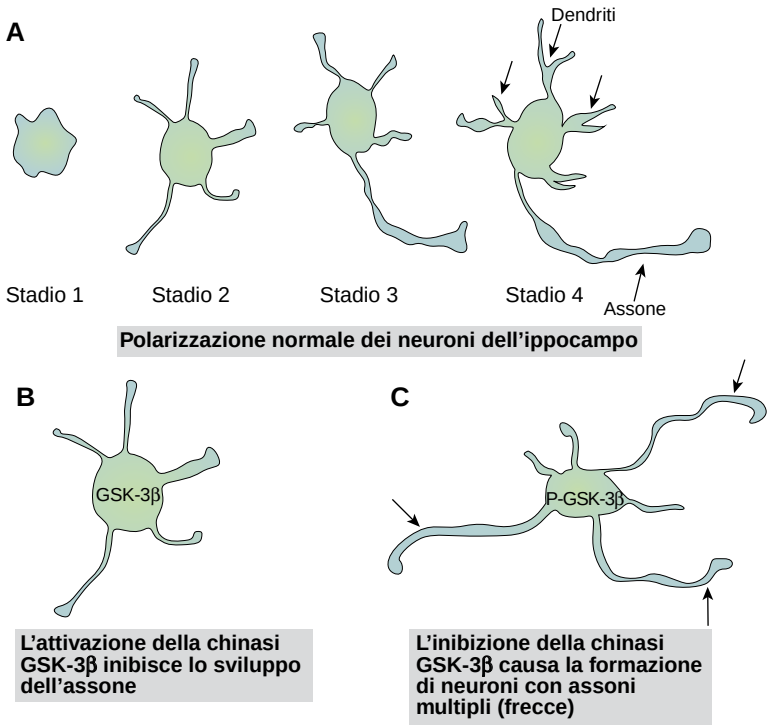



**Figura 13-32** ■ Ruolo della chinasi GSK-3β nello sviluppo dell'assone.

identificate diverse famiglie di proteine capaci di esercitare un ruolo nella guida della crescita assonale quali **Epinefrine**, **Netrine**, **Slits** e **Semaforine** e i loro rispettivi recettori distribuiti lungo il cammino dei diversi assoni. La maggior parte di queste molecole può attrarre o respingere l'assone attivando vie di segnalazione che comportano l'aumento di concentrazione intracitoplasmatica di nucleotidi ciclici quali cAMP e cGMP e ioni $Ca^{2++}$. Gli stimoli che guidano la crescita assonale provocano inoltre sintesi o degradazione proteica locale ed endocitosi, eventi che permettono la compartimentalizzazione di modificazioni del cono di crescita. Infatti la cascata di segnali che deriva da queste interazioni si ripercuote alla fine sull'assetto del citoscheletro, in particolare dei microfilamenti di β-actina, del cono di crescita che quindi promuove il suo movimento verso la destinazione finale (Fig. 13-33).

## *L'NGF e i fattori neurotrofici che controllano la sopravvivenza dei neuroni*

Durante lo sviluppo embrionale molte cellule degenerano fisiologicamente in modo da consentire il raggiungimento del numero corretto di cellule in un determinato tessuto o il rimodellamento di tessuti e strutture che devono modificare la loro forma o che non sono più necessarie. Questi processi degenerativi, che avvengono nell'embrione e nel feto in un determinato momento e in un determinato tessuto, sono chiamati **morte cellulare programmata** (PCD, programmed cell death). Essi fanno parte di fenomeni di morte cellulare che avvengono in modo controllato dalle stesse cellule mediante l'attivazione di geni e specifiche vie biochimiche chiamati complessivamente **apoptosi**, necessari anche nell'adulto per l'omeostasi tissutale. Alcuni ricercatori pensano che nell'embrione alcune popolazioni proliferino in modo eccessivo. Perciò si rende necessario che il numero delle cellule differenziate venga ridotto.

Come è stato già sottolineato in precedenza, durante lo sviluppo del sistema nervoso si produce un numero elevatissimo di neuroni e cellule della nevroglia. Sia nel periodo prenatale che dopo la nascita e probabilmente per tutta la vita, si verifica un rimaneggiamento delle popolazioni neuronali/gliali e delle strutture nervose, in particolare dei circuiti neuronali, mediante processi che implicano PCD. Ciò comporta la selezione dei neuroni che contribuiscono alle attività funzionali necessarie all'attività complessiva del sistema nervoso e, in ultima analisi, ha come conseguenza un rimodellamento delle connessioni sinaptiche. Un risultato analogo viene ottenuto dal nostro sistema nervoso con un meccanismo più fine e meno dispendioso rappresentato dalla selezione delle connessioni sinaptiche. In altri termini, l'elevatissimo numero di neuroni presenti nel periodo embrionale permette di formare molti più circuiti neuronali e connessioni sinaptiche di quelle effettivamente necessari. Vengono allora messi in atto processi di maturazione e PCD del tessuto nervoso che riducono il numero dei neuroni e di contatti sinaptici. In

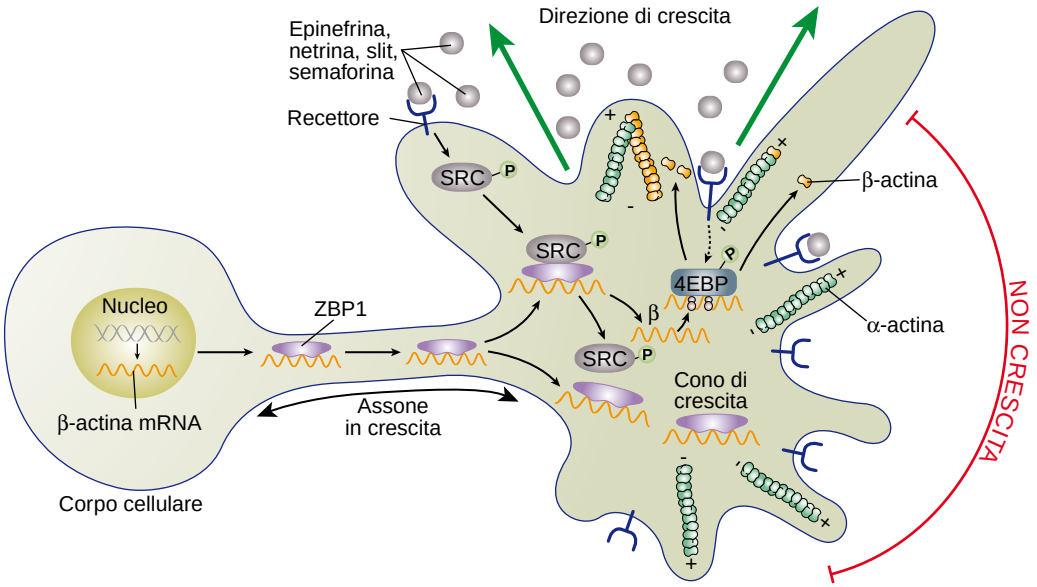



**Figura 13-33** ■ Modello di meccanismo molecolare della crescita assonale. Un ruolo chiave in questo processo è svolto dalla β-actina (una delle tre isoforme di actina, le altre sono α- e γ-actina). È stato dimostrato che la traslocazione dell'mRNA della β-actina è controllata dalla proteina ZBP1 (Z-DNA binding protein). ZBP1 si associa con l'mRNA della β-actina, bloccandone la traduzione. La traduzione della β-actina è regolata da modificazioni post-traduzionali, come la fosforilazione. In particolare, la chinasi SRC attivata (fosforilata) in risposta al legame di segnali guida (epinefrine, netrine, slit, semaforine) ai recettori di superficie, fosforila ZBP1 che come tale si dissocia dall'mRNA della β-actina, mentre la fosforilazione di un altro fattore quale 4EBP promuove l'inizio della sintesi della β-actina. Questi eventi portano nel loro insieme ad una distribuzione asimmetrica delle molecole di actina all'interno del cono di crescita che ne determinano la direzionalità di crescita (frecce).

particolare esperimenti condotti su sistemi in vitro costituiti da neuroni e strutture muscolari, hanno permesso di osservare che le sinapsi meno utilizzate vengono ridotte nella loro estensione ed eliminate. Nei neuroni alcune evidenze indicano che la PCD avverrebbe per una sorta di selezione competitiva tra neuroni. Le cellule nervose competono tra loro per attuare le connessioni verso bersagli capaci a loro volta di fornire fattori trofici (nutritivi) che ne garantiscono la sopravvivenza chiamati **fattori neurotrofici** e che spesso corrispondono a specifici fattori di crescita. Le cellule che non acquisiscono adeguate quantità di fattori muoiono in seguito a PCD. In questo modo il numero ridondante di neuroni prodotti durante lo sviluppo viene ridimensionato e adeguato alle funzioni che il sistema nervoso dovrà svolgere.

Il primo fattore neurotrofico identificato negli anni '50 è stato il **fattore di crescita nervoso**, o **NGF** (nerve growth factor). Fu scoperto dal premio Nobel 1986 italiano Rita Levi Montalcini mediante esperimenti condotti trapiantando tessuti estranei e tumori in embrioni di pollo. I trapianti di un tumore ricevevano una fitta innervazione e determinavano, intorno alla sede in cui venivano collocati, un significativo incremento di alcune popolazioni neuronali: i neuroni sensoriali e i neuroni simpatici. Si comprese poi che la rigogliosa innervazione e l'incremento dei neuroni era dovuto all'effetto dell'NGF. Anche nelle colture cellulari la presenza di NGF, permette la sopravvivenza di neuroni sensoriali e simpatici e li stimola ad emettere prolungamenti (Fig. 13-34). In assenza di NGF, i neuroni simpatici e alcuni dei neuroni sensoriali muoiono. Si è poi osservato che NGF agisce in maniera simile rispetto ai neuroni simpatici e sensoriali anche su alcune classi di neuroni del sistema nervoso centrale. L'NGF è prodotto dai tessuti che sono innervati dai neuroni NGF-dipendenti. Oltre a questo ruolo iniziale riconosciuto durante lo sviluppo dei circuiti di innervazione a livello embrionale, NGF continua ad esercitare un ruolo più tardivo, nella regolazione delle caratteristiche dell'innervazione esercitando un controllo sui processi di formazione locale delle ramificazioni degli assoni. Questo meccanismo si rivela di estremo interesse anche nel controllo del ripristino dell'innervazione di tessuti dopo una lesione. In vivo NGF funziona come in coltura cioè mantenendo la vitalità delle cellule e promuovendo l'attività del cono di crescita, e di conseguenza controllando l'innervazione a seconda delle necessità del tessuto da innervare. L'NGF è un membro di una famiglia di fattori ad azione neurotrofica detti **neurotrofine**, responsabili della regolazione dell'innervazione in diverse parti del sistema nervoso

## *Mielinogenesi*

Gli assoni della maggior parte dei neuroni vengono progressivamente rivestiti da una guaina di plasmalemma a

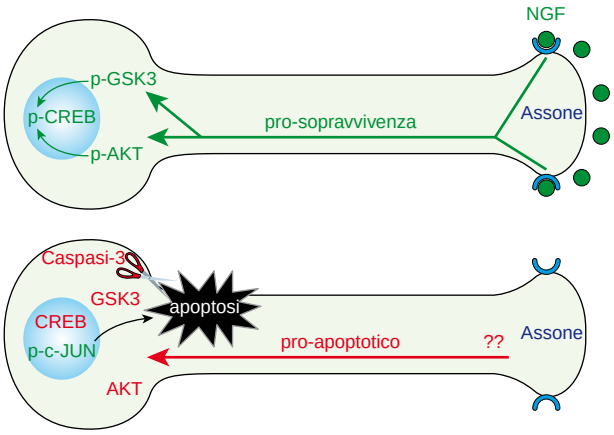



**Figura 13-34** ■ Modello dell'azione neurotrofica dell'NGF sui neuroni simpatici. *A)* La sopravvivenza di questi neuroni dipende dall'espressione di geni attivati dal fattore di trascrizione CREB; per essere attivo CREB deve essere fosforilato (p-CREB) da parte di chinasi come AKT e GSK3 che a loro volta devono essere fosforilate (p-AKT e p-GSK3) da molecole non identificate che vengono prodotte dall'attivazione di recettori per l'NGF a livello della terminazione assonica e che vengono trasportate nel pirenoforo dal flusso asso plasmatico retrogrado. *B)* In assenza di NGF segnali pro-apoptotici non bene identificati (??) causano la defosforilazione di GSK3 e AKT con conseguente de fosforilazione di CREB ed attivazione della caspasi 3; allo stesso tempo la fosforilazione di c-JUN (p-c-JUN) attiva nel nucleo geni dell'apoptosi.

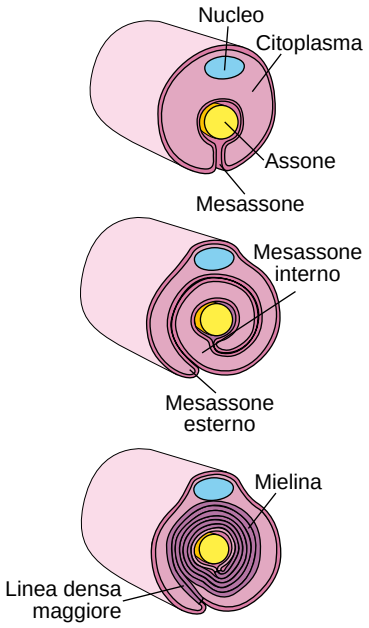



**Figura 13-35** ■ Rappresentazione schematica di formazione della guaina mielinica.

più strati chiamata **mielina** indispensabile a garantire la loro capacità di trasmettere velocemente (fino a 100 m al secondo!) l'impulso nervoso. Questo processo è chiamato **mielinizzazione** ed è operato dagli oligodendrociti nel SNC e dalle cellule di Schwann nel SNP. Gli assoni che non vengono mielinizzati sono detti amielinici e conducono l'impulso nervoso molto più lentamente di quelli mielinizzati.

Il processo di mielinizzazione inizia nel sistema nervoso periferico, in corrispondenza delle radici dei nervi spinali, alla fine del quarto mese di vita intrauterina; più tardiva è la mielinizzazione delle fibre del SNC, con inizio a partire dal 6° mese. Il processo di mielinizzazione comincia con un avvolgimento della cellula mielinizzante intorno all'assone per formare il mesassone esterno (Figg. 13-35 e 13-36). Lo stadio successivo è caratterizzato da avvolgimenti multipli e concentrici di plasmalemma intorno all'assone con progressiva espulsione di citoplasma. Lo stretto accollamento di membrane spiega la rifrangenza "bianca" della mielina. Ogni cellula di Schwann è in grado di mielinizzare un tratto di un singolo assone, mentre un oligodendrocito provvede a mielinizzare singoli tratti di diversi assoni (fino a circa 50). La mielinizzazione è un processo lento e cruciale di maturazione del sistema nervoso associato all'acquisizione delle capacità motorie dell'individuo e al suo comportamento. Come visto esso inizia verso il quarto mese di vita intrauterina e continua fino alla pubertà. Il massimo periodo di mielinizzazione avviene tra il terzo trimestre di vita intrauterina e i due anni di vita dopo la nascita, diminuendo via via fino alla pubertà. La mielinizzazione avviene in modo asincrono nelle varie regioni del cervello. Utilizzando indagini di MRI (magnetic resonance image) è stato visto che sono le fibre nervose cerebellari e pontine che vengono mielinizzate per prime; quelli dei lobi occipitali e parietali si osservano mielinizzate intorno ai 5-6 mesi di vita postnatale, quelle del lobo frontale ad otto mesi dalla nascita. Assai più tardiva è la mielinizzazione delle vie nervose collegate con la corteccia prefrontale, che è sede dei processi mentali superiori, che non si completa prima della pubertà.

Diversi studi hanno cominciato a chiarire i meccanismi molecolari coinvolti nella mielinogenesi e nel mantenimento della guaina mielinica. Qui descriveremo solamente alcuni degli aspetti iniziali di questo processo rimandando ai testi di Istologia per la descrizione completa di questo processo. Prima della nascita, le cellule di Schwann inviano i loro prolungamenti citoplasmatici all'interno di fasci di assoni e progressivamente smistano gli assoni per poterli mielinizzare in un processo noto come ***radial sorting*** (smistamento radiale). Un ruolo chiave in questo processo viene svolto dalle integrine (Fig. 13-37). È stato osservato che le cellule di Schwann promielinizzanti (stadio precoce) esprimono le subunità integriniche α6β1 insieme a **distroglicani**, proteine importanti per la stabilizzazione della membrana plasmatica. Le cellule di Schwann mielinizzanti (stadio avanzato della mielinogenesi) esprimono prevalentemente le subunità integriniche α6β4, distroglicani e due proteine ad essi associate quali la **proteina associata al distroglicano-2** (**DRP2**) e la **Periaxina** (Fig. 13-38). Questi diffe-

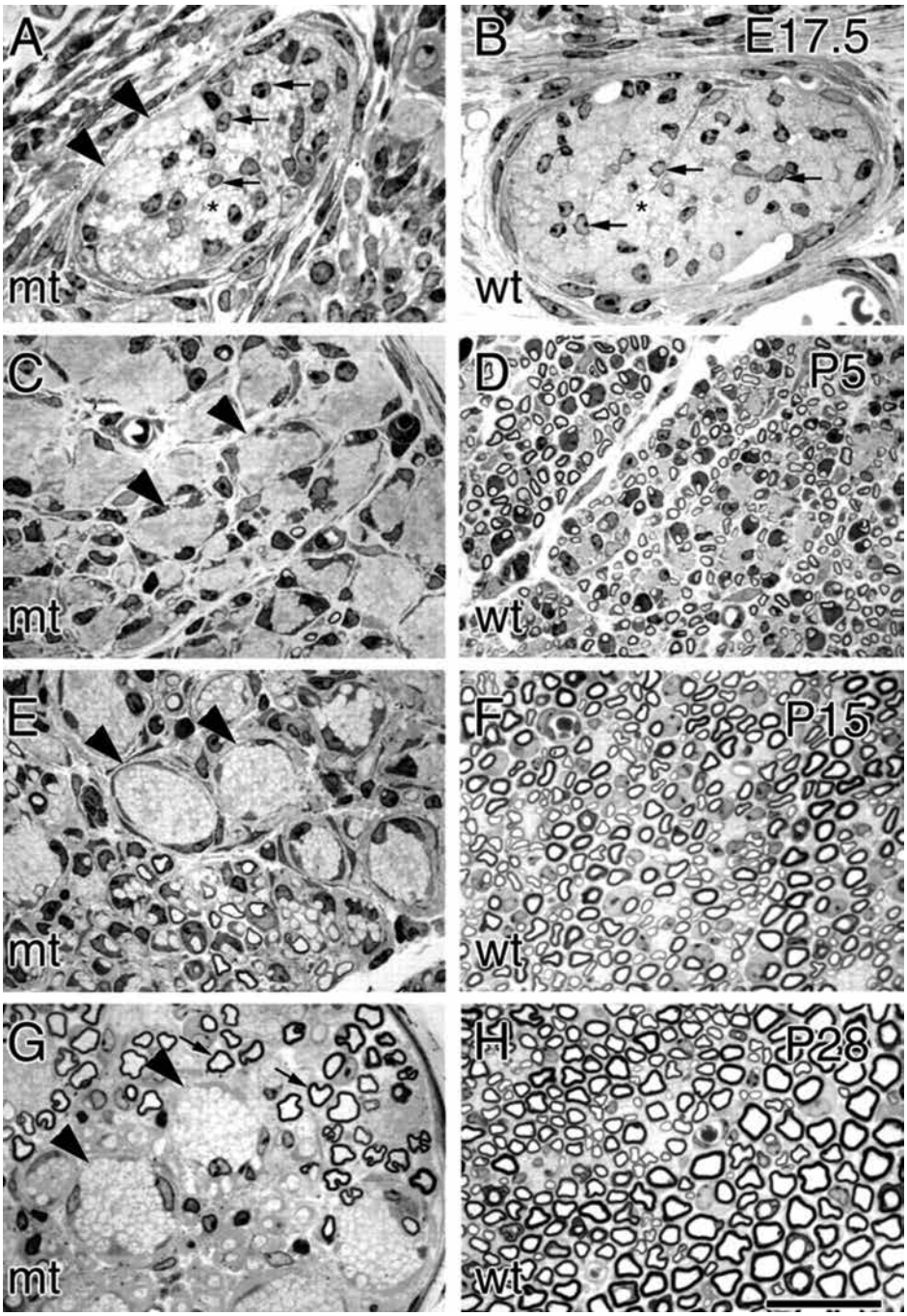



**Figura 13-36** ■ Sezioni semifine trasversali di nervi ottenute da topi mutanti *(mt; A, C, E e G)* e di controllo *(wt; B, D, F e H)* a 17,5 giorni di vita intrauterina (E17.5) *(A e B)*, e P5 *(C e D)*, P15 *(E e F)* e P28 *(G e H)* giorni della vita post natale. A E17.5 *(A, B)* sia il controllo sia i topi mutanti contengono gruppi di assoni non ancora risolti (asterischi) e numerose cellule di Schwann tra loro (frecce). A P5 si cominciano ad apprezzare le differenze tra topi di controllo e mutanti: nel wt *(D)* si osservano assoni di grosso calibro che hanno già raggiunto il rapporto 1:1 con la cellula di Schwann, mentre nel nei nervi del topo mutante si osservano numerosi gruppi di assoni non segregati (*C,* frecce) e si formano soltanto rare e molto piccole guaine mieliniche. A P28 il processo di mielinizzazione è completato nei topi normali (wt), mentre i nervi mutanti mostrano larghi fasci di assoni non sortati (*G*, frecce grandi) e pochissime fibre mie linizzate (frecce piccole). (*Da* M. Laura Feltri e coll., Conditional disruption of β1 integrin in Schwann cells impedes interactions with axons, The Journal of Cell Biology, 156, 1, 199-209, 2002, doi:10.1083/jcb.200109021, per gentile concessione di The Rockefeller University Press)

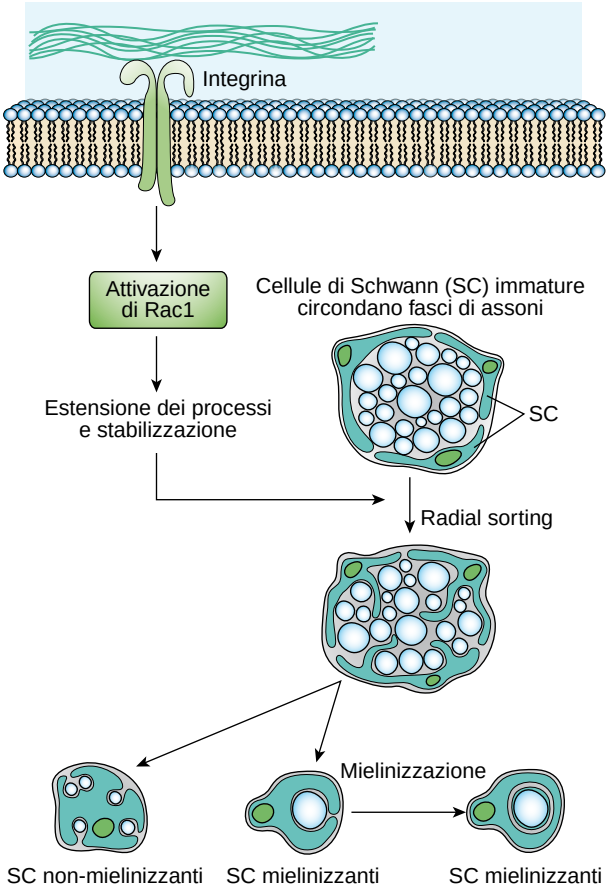



**Figura 13-37** ■ Rappresentazione schematica del meccanismo molecolare proposto per la regolazione dello sviluppo della guaina mielinica da parte delle cellule di Schwann: l'interazione delle integrine con molecole della matrice attiva Rac1GTPase che, a sua volta, attiva il citoscheletro delle cellule di Schwann.

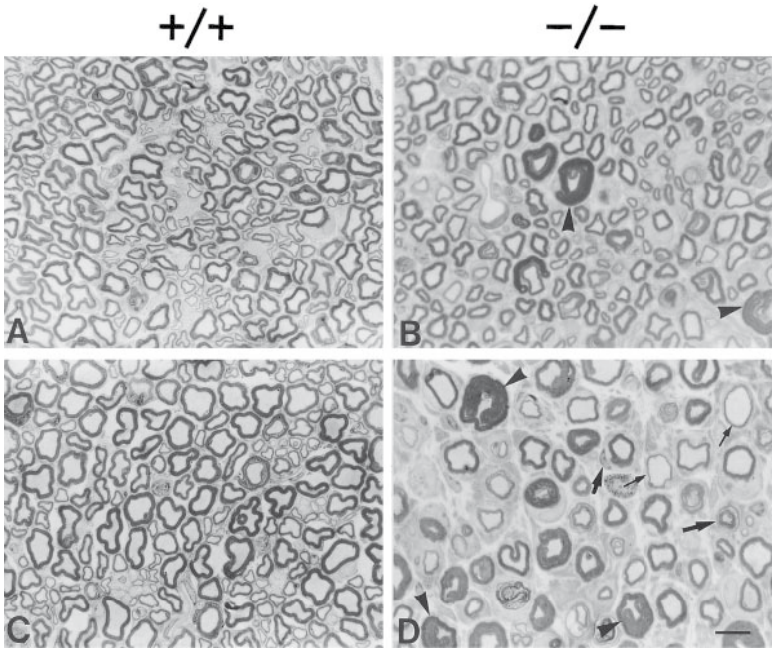



**Figura 13-38** ■ Sezioni ultrasottili di nervo sciatico di topi normali *(A,C)* e knock out per la periaxina *(B,D)* a 6 settimane *(A,B)* e a 6 mesi *(C,D)*. I topi mutanti *(B,D)* mostrano caratteristiche tipiche di una progressiva neuropatia demielinizzante. (*Da* C. Stewart Gillespie e coll., Peripheral demyelination and neuropathic pain behavior in periaxin-deficient mice, Neuron, 26, 523-531, 2000, per gentile concessione di Elsevier)

renti livelli di espressione delle diverse proteine hanno fatto supporre per ciascuna di esse un ruolo determinate nelle fasi di mielinizzazione e successivamente nel mantenimento della guaina mielinica. Questa ipotesi è stata avvalorata da esperimenti di "gene knock out" in cui nei topi sono stati silenziati alcuni dei geni espressi dalle cellule di Schwann promielinizzanti e mielinizzanti. In particolare è stato osservato che il silenziamento del gene per l'**integrina β1** determina un'alterazione del processo di "radial sorting" ovvero un'alterazione nello smistamento degli assoni che pertanto rimangono raggruppati in fasci, mentre il silenziamento del gene per la periaxina non interferisce con la formazione della guaina mielinica, ma con il mantenimento della guaina mielinica stessa (Fig. 13-38).

## *Molecole che promuovono il differenziamento delle cellule delle creste neurali*

Le cellule della cresta neurale (NC) sono inizialmente indotte da una serie di segnali che avvengono proprio al confine tra l'ectoderma neurale in formazione (neuroectoderma) e quello non neurale. Successivamente le cellule della NC vanno incontro ad un processo di perdita di adesione cellula-cellula, riarrangiamento citoscheletrico e modificazioni morfologiche che le permetterà di delaminare e staccarsi dal neuroectoderma del tubo neurale (transizione epitelio-mesenchimale). Nello stesso momento, queste cellule acquisiranno capacità migratorie attraverso la produzione di **metalloproteasi** (MMP, enzimi proteolitici responsabili della degradazione e rimodellamento della matrice extracellulare e dipendenti da ioni metallici per la loro attività catalitica) e specifici recettori di membrana, come le integrine, che permetteranno loro di rispondere a molecole segnale presenti nel micro-ambiente orientando così le loro vie di migrazione. Questa complessa successione di eventi, dall'induzione delle creste neurali al differenziamento delle cellule NC è regolato da una serie di geni regolatori.

Le cellule localizzate al confine della placca neurale sono inizialmente indotte a divenire cellule della NC da molecole quali **BMP**, **WNT** e **FGF**. È stato proposto che l'esposizione, delle cellule più laterali del neuroectoderma, a livelli intermedi di **BMP** rende competenti tali cellule all'azione dei **WNT** (prodotti dall'ectoderma non neurale e dal mesoderma parassiale) e dell'**FGF** (prodotto dal mesoderma parassiale), che a loro volta inducono l'espressione di fattori di trascrizione come **PAX3** (paired box 3) e **ZIC1** (zinc finger protein of the cerebellum 1) (Fig. 13-39). Quest'ultimi mediano, quindi, l'espressione di una serie di molecole responsabili del differenziamento delle cellule del neuroectoderma in cellule della NC. Alcune di queste molecole sono dei regolatori trascrizionali come **Snail** e **FOXD3** (forkhead box D3), responsabili del cambiamento fenotipico delle cellule NC noto come transizione epitelio-mesenchimale.

Una volta che le cellule delle creste hanno acquisito la capacità di migrare, grazie alla perdita dell'espressione di **N-caderina**, alla temporanea espressione di un'altra molecola adesiva, **N-CAM** (Fig. 13-40), e alla nuova espressione di recettori integrinici, devono muoversi nella matrice extracellulare che le circonda. Molecole

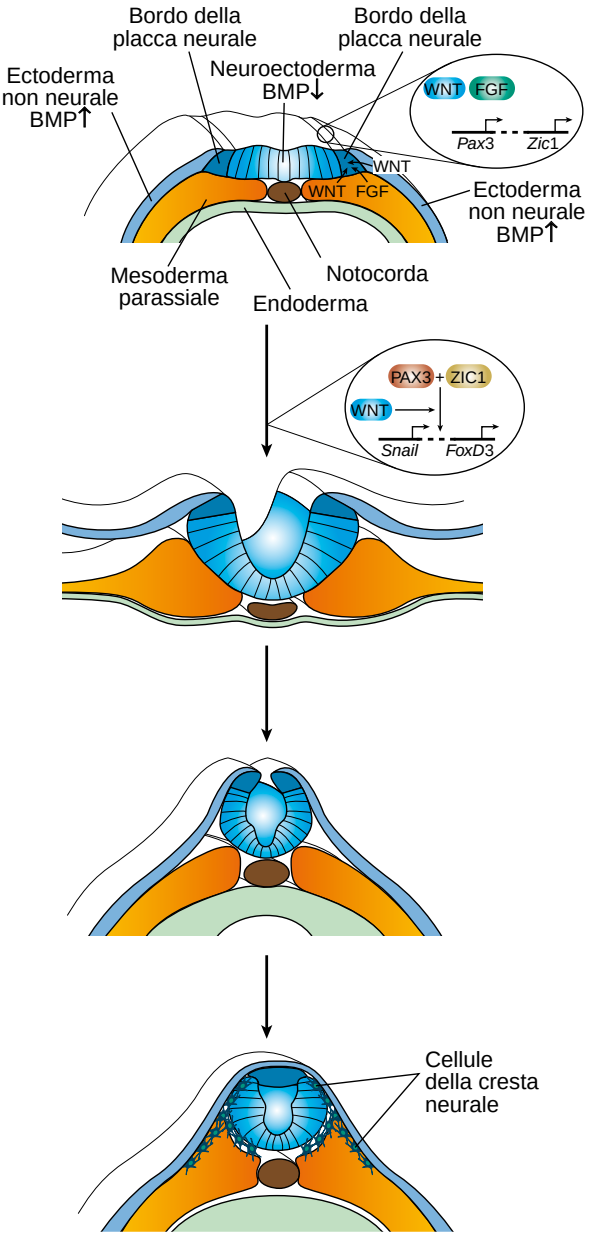



**Figura 13-39** ■ Processi regolativi nella formazione delle cellule della cresta neurale. Il processo induttivo inizia al confine della placca neurale ed è mediato da FGF (secreto dal sottostante mesoderma parassiale) e dai WNT (secreti dall'ectoderma non neurale e dal mesoderma parassiale). Livelli intermedi di BMP rendono competenti le cellule di confine all'azione dei WNT e FGF che a sua volta inducono l'espressione dei fattori di trascrizione PAX3 e ZIC1. Quest'ultimi, in modo dipendente dai WNT, aumentano i livelli dei regolatori trascrizionali Snail e FOXD3, che sono i principali determinanti della formazione delle cellule della cresta neurale.

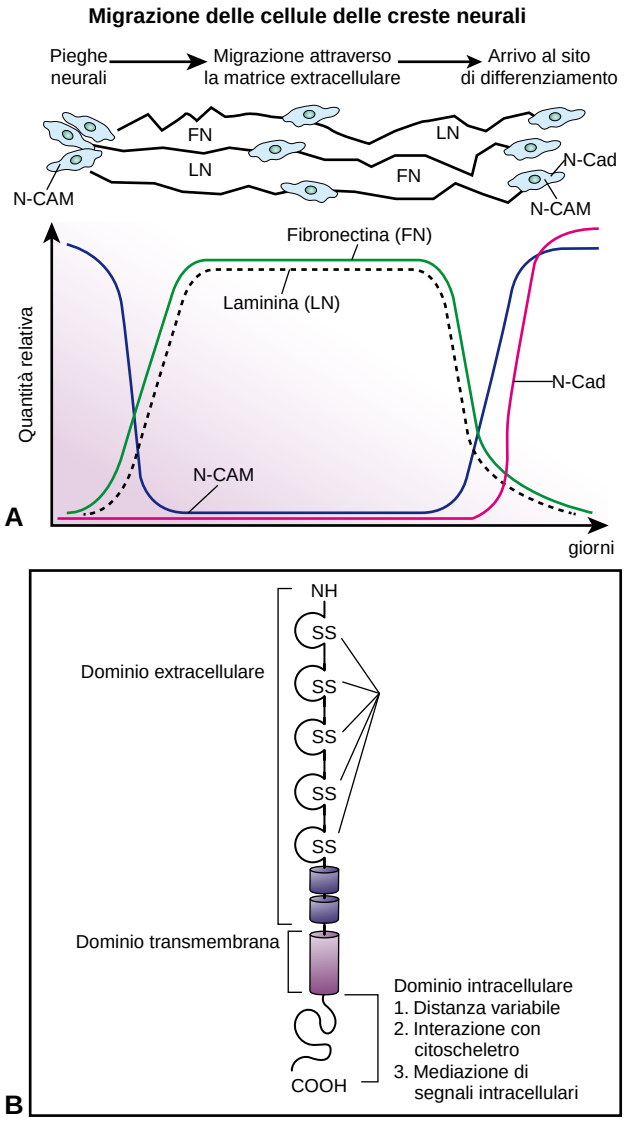



**Figura 13-40** ■ Molecole adesive e della matrice extracellulare coinvolte nella migrazione delle cellule delle creste neurali (NC). *A)* Osservare come N-CAM è espressa nelle cellule della NC prima che inizino a migrare, per poi scomparire durante la migrazione e ricomparire al termine di essa insieme a N-Cad. Solamente durante la migrazione le cellule della NC aderiscono alla FN e alla LN mediante recettori integrinici. *B)* Disegno schematico della struttura molecolare di N-CAM (neural-cell adhesion molecule).

della matrice come la **Fibronectina** e la **Laminina** agiscono come componenti "permissive" del substrato che incoraggiano l'attacco delle cellule delle creste neurali e la loro diffusione. Anche la **Trombospondina** gioca un ruolo nel dirigere il percorso delle cellule della NC in migrazione. Al contrario proteoglicani del tipo del condroitinsolfato sono molecole "non permissive" per la migrazione. Un bilanciamento tra componenti permissive e non permissive della matrice sembra essere necessario per assicurare una migrazione efficace. Oltre alle componenti della matrice, intervengo nel guidare la migrazione anche segnali solubili attrattivi o repulsivi derivati dalle cellule. La proteina **Efrina** è un segnale repulsivo espresso nello sclerotomo che influisce sul cammino delle NC. Un importante segnale attrattivo invece coinvolto nell'indirizzare la migrazione delle cellule delle creste è l'**SCF** (stem cell factor) che influenza soprattutto la localizzazione dei melanociti. Altri specifici segnali attrattivi fanno sì che le cellule delle NC raggiungano le loro finali destinazioni realizzando il cosiddetto ***homing*** (accasamento) nei tessuti dove andranno incontro al loro finale differenziamento.

## ASPETTI CLINICI

### *Anomalie dello sviluppo del SNC*

La chiusura del tubo neurale rappresenta una fase critica nello sviluppo del sistema nervoso centrale. Infatti, quando il tubo neurale non si chiude correttamente e completamente durante le prime settimane di gravidanza, il bambino sviluppa gravi malformazioni congenite come la **spina bifida** e l'**anencefalia**. La maggior parte di queste condizioni è multifattoriale e risulta quindi dalla combinazione di elementi genetici e ambientali. La spina bifida è il difetto più frequente, dovuto a un'incompleta chiusura della parte posteriore del tubo neurale. L'80-90% dei bambini con spina bifida sopravvivono fino all'età adulta, ma possono andare incontro a gravi disabilità come paralisi degli arti inferiori, difficoltà di controllo degli organi interni (intestino e vescica), difficoltà nello sviluppo e apprendimento e ritardo mentale, talvolta **idrocefalia**.

Un fattore importante nella prevenzione dei difetti di chiusura del tubo neurale è l'**acido folico** (**folato** o **vitamina B9**). L'acido folico è risultato efficace nel prevenire i difetti del tubo neurale e in minor misura altre malformazioni congenite quali i difetti del cuore settali e troncoconali, le labiopalatoschisi, le uropatie ostruttive, le ipo/agenesie degli arti. Una supplementazione giornaliera con acido folico (0,4 mg al giorno) nel periodo periconcezionale dovrebbe essere raccomandata a tutte le donne che programmano una gravidanza o che comunque non la escludono. In passato le anomalie dello sviluppo del sistema nervoso più note erano quelle che provocavano precocemente decesso del neonato o quelle che potevano essere evidenziate al tavolo anatomico. Il progresso tecnologico ha consentito di mettere a punto metodiche diagnostiche in campo radiologico come la Tac (tomografia assiale computerizzata) o la risonanza magnetica mediante le quali è possibile osservare nel vivente, anche in fasi molto precoci, delle anomalie che, altrimenti, non sarebbero messe in evidenza. Ciò ha consentito anche un notevole approfondimento delle conoscenze su malattie che prima avevano solo un'espressione funzionale, sintomatologica come ad esempio gli stati convulsivi e l'epilessia, mentre oggi trovano spiegazioni in precisi aspetti anatomici alterati legati ad anomalie dello sviluppo del sistema nervoso.

**TABELLA 13-1**
Patologie dello sviluppo del sistema nervoso

| |
|---|
| ■ **Disordini formazione e della chiusura del tubo neurale** |
| Cranioschisi |
| Anencefalia |
| Amielia |
| Spina bifida occulta |
| Spina bifida cistica |
| ■ **Disordini della circolazione del liquor** |
| Idrocefalo |
| ■ **Disordini della divisione del prosencefalo** |
| Oloprosencefalia |
| Displasia septo ottica |
| Agenesia del corpo calloso |
| ■ **Disordini della proliferazione neuronale e gliale** |
| Microcefalia |
| Megalencefalia |
| Emimegalencefalia |
| ■ **Disordini della migrazione neuronale** |
| Schizencefalia |
| Lissencefalia |
| Lissencefalia classica |
| Lissencefalia cobblestone |
| Polimicrogiria |
| Eterotopie |
| Atassia cerebellare |
| ■ **Anomalie del circolo cerebrale** |
| ■ **Sindrome di Arnold-Chiari** |

Nella tabella è riportato un quadro generale delle patologie del sistema nervoso dovute a difetti dello sviluppo alcune delle quali sono descritte nel testo.

## Alterazioni della chiusura del tubo neurale (difetti di chiusura o stati disrafici)

Sono causate da agenti teratogeni quali l'esposizione alle radiazioni ionizzanti, infezioni come la toxoplasmosi e l'ipovitaminosi A. Si tratta di schisi o aperture di grado diverso delle ossa craniche o vertebrali, delle meningi e del sistema nervoso dovute ad un alterato meccanismo di chiusura del tubo neurale che si verifica, in genere, in prossimità dei neuropori. La mancata chiusura del tubo neurale può essere a sua volta la causa dei difetti di formazione dell'osso circostante per mancata induzione.

## Spina bifida

Questa anomalia consiste nella mancata chiusura dell'arco di una o più vertebre. Il difetto di chiusura è dovuto nella gran parte dei casi alla mancata chiusura del neuroporo posteriore e la gravità dipende dal tipo di strutture che fuoriescono dalla colonna vertebrale a livello dell'apertura per cui si possono distinguere due forme (Fig. 13-41).

## Spina bifida occulta

È una forma abbastanza frequente nell'età neonatale che poi diventa più rara nell'adulto in conseguenza della chiusura più tardiva delle strutture nervose. Caratterizzata unicamente da assenza di saldatura dell'arco posteriore delle vertebre, talvolta si accompagna a modificazioni della pelle circostante come ad esempio la presenza di un ciuffo di peli (Fig. 13-41A).

## Spina bifida cistica

È presente in 1 caso su 1000 nascite. Si dice cistica perché si accompagna a fuoriuscita di alcune strutture dall'apertura. Quando la protrusione interessa le strutture delle meningi si parla di **meningocele** (Fig. 13-41B). A volte vi è fuoriuscita anche del tessuto nervoso e allora si parla di **mielomeningocele** (Fig. 13-41C). La forma cistica può essere accompagnata da anomalie dello sviluppo della parte caudale del midollo spinale e quindi può provocare disturbi di innervazione agli arti inferiori e ai visceri contenuti nella parte inferiore della cavità addominale come vescica e ultimo tratto del tubo intestinale (Fig. 13-42).

## Anencefalia

L'anencefalia è una condizione in cui il cervello si sviluppa in modo incompleto o non si sviluppa affatto in

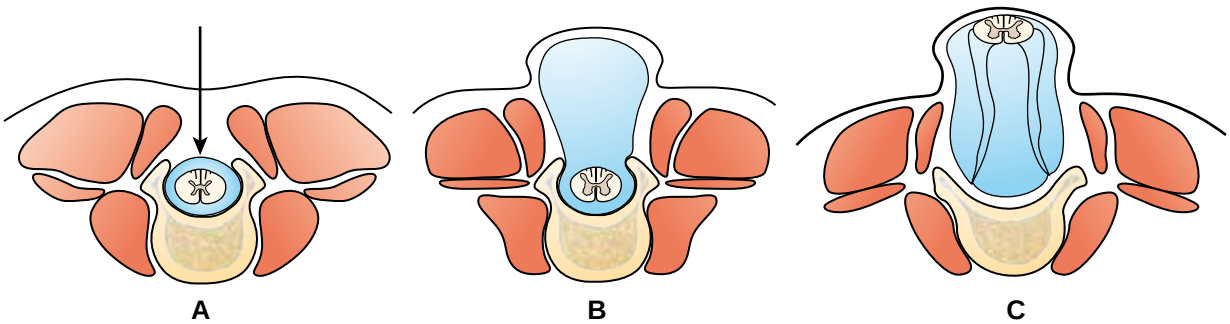



**FIGURA 13-41** ■ Schema che mostra varie forme di spina bifida. *A)* Spina bifida occulta, schisi limitata ad un difetto di chiusura di alcuni archi vertebrali (freccia). *B)* Spina bifida complicata da meningocele. *C)* Spina bifida complicata da mielomeningocele.

**Figura 13-42** ■ Neonato affetto da spina bifida cistica.

seguito alla incompleta chiusura della parte superiore del tubo neurale. I bambini con anencefalia muoiono prima della nascita o subito dopo. In alcuni casi, l'assenza di chiusura del prosencefalo può portare alla mancata chiusura delle ossa del cranio perché il tubo neurale non si distacca dall'ectoderma. Le ossa del cranio non si chiudono e attraverso l'apertura delle ossa può protrudere una tasca meningea ripiena di liquido cefalorachidiano (meningocele) a volte accompagnato anche del tessuto nervoso (**encefalocele**). È incompatibile con la vita. Si può associare a spina bifida aperta che si estende per tutto il midollo (**craniorachischisi**) (Fig. 13-43).

**Figura 13-43** ■ Neonato affetto da anencefalia. (*Da* G. Canepa, P. Maroteaux, V. Pietrogrande, Sindromi dismorfiche e malattie costituzionali dello scheletro, vol. II, Piccin Nuova Libraria, Padova, 1996)

**Figura 13-44** ■ Neonato affetto da idrocefalo. (*Da* G. Fradà, G. Fradà, Semeiotica medica, Piccin Nuova Libraria, Padova, 2009).

## Idrocefalo

È conseguenza di uno squilibrio tra produzione e riassorbimento del liquor che provoca aumento della pressione e del volume del liquor. Ciò produce un progressivo aumento di volume della scatola cranica e compressione del tessuto nervoso contro la scatola cranica stessa. Nella maggior parte dei casi è dovuto a ostruzione o dell'acquedotto del Silvio oppure dei forami presenti nel IV ventricolo. Spesso si associa ad altre malformazioni (Fig. 13-44).

## Difetti della suddivisione del prosencefalo

### Oloprosencefalia

L'oloprosencefalia è un disordine eterogeneo della suddivisione del prosencefalo che risulta da un'incapacità della vescicola prosencefalica a dividersi normalmente per dare luogo alle due vescicole telencefaliche. Sono state descritte tre forme: alobare, semilobare e lobare.

Nella forma alobare l'incapacità delle vescicole telencefaliche a dividersi dà luogo ad un solo ventricolo con forma a ferro di cavallo, con la conseguente formazione, a volte, di una struttura cistica dorsale e di una corteccia cerebrale malformata. Nella forma semilobare la scissura interemisferica, che suddivide i due telencefali sulla linea mediana, è presente posteriormente, ma i lobi frontali e a volte anche i parietali si continuano attraverso la linea mediana; in alcuni casi si nota anche fusione ventrale. Nella forma lobare si notano solamente alterazioni minori: la falce anteriore e il setto pellucido sono di solito assenti, i lobi frontali sono ipoplastici e vi possono essere anormalità nel corpo calloso. Solo i bambini con forma lobare e semilobare sopravvivono qualche mese. L'oloprosencefalia è stata associata a diabete materno, esposizione ad acido retinoico, citomegalovirus e rosolia. Esistono anche anomalie cromosomiche associate con questa anomalia: esse includono trisomia 13 e 18, duplicazioni di 3p, 13q e 18q e delezioni in 2p, 7q, 13q, e 18q.

Esiste una forma autosomica dominante in cui mutazioni di sonic hedgehog portano a un'espressione variabile della oloprosencefalia. Molti altri geni (Hpe1-4, holoprosencephaly 1-4), Zic2 (zinc finger protein of the cerebellum), Six3 (sine oculis homeobox 3), sono stati associati alla oloprosencefalia, ma il riscontro sembra essere casuale.

#### Displasia septo-ottica

La displasia septo-ottica (sindrome di de Morsier) è un disordine caratterizzato da assenza del setto pellucido, ipoplasia del nervo ottico, e disfunzione ipotalamica. Può essere associata anche con agenesia del corpo calloso. Sembra coinvolgere anche la suddivisione del prosencefalo e lo sviluppo delle strutture telencefaliche anteriori. Circa il 50% dei pazienti con displasia septo-ottica è affetto da schizencefalia (vedi in seguito).

### Difetti della proliferazione neuronale e gliale

#### Microcefalia

La microcefalia primaria si osserva in molte sindromi genetiche e, nella sua forma isolata può essere autosomica recessiva, autosomica dominante o legata al cromosoma X. Microcefalia *vera* è il termine più spesso applicato a questa forma genetica di microcefalia. I bambini affetti hanno una circonferenza della testa che è abitualmente più di 4 deviazioni standard sotto la media. All'esame istologico sono scomparsi i neuroni di alcuni strati della corteccia cerebrale. Possono dar luogo a microcefalia anche le lesioni distruttive del cervello in via di formazione come quelle causate da teratogeni e da agenti infettivi. Teratogeni degni di nota sono l'alcool, la cocaina e parafenilalaninemia (fenilchetonuria materna). Anche un'esposizione intensa a radiazioni nel primo trimestre può causare microcefalia. Per quanto concerne gli agenti infettivi la microcefalia e il reperto di calcificazioni intracraniche sono probabilmente dovute a infezioni in utero causate da citomegalovirus, toxoplasmosi e virus della immunodeficienza umana.

#### Megalencefalia e emimegalencefalia

I termini **megalencefalia** e **emimegalencefalia** si riferiscono a disordini in cui il volume del cervello o di una parte di esso è più grande che nel normale non a causa di abnorme accumulo di materiale che abitualmente si accompagna a macrocefalia ovvero a una testa ingrossata. Sebbene considerato da alcuni come un disordine della migrazione cellulare, l'aumento delle misure del cervello in questi disordini sembra attribuibile a errori della proliferazione neuroepiteliale dal momento che l'aspetto microscopico del cervello è di un incremento del numero di cellule (sia neuroni che glia) e della misura delle cellule stesse.

#### Schizencefalia (fissurazione cerebrale)

Questo disturbo dello sviluppo, almeno nella sua forma più grave, sembra essere il risultato di mancanza di specificazione regionale di un clone di cellule che sono destinate a essere parte della corteccia. Clinicamente questi pazienti variano a seconda dell'estensione della bilateralità o meno del difetto. Le fessurazioni si estendono dalla pia madre al ventricolo e sono demarcate da una sostanza grigia polimicrogirica (vedi più avanti). La pia e l'ependima sono usualmente apposte specie nei casi gravi. Il difetto si dice: a labbra aperte se le pareti della fessura sono separate da fluido cerebrospinale; a labbra chiuse se le pareti sono in contatto l'una con l'altra. I pazienti affetti da schizencefalia spesso sono microcefali. Le lesioni possono verificarsi isolatamente oppure possono essere associate con altre anomalie dello sviluppo del cervello.

Si ipotizza che la formazione della corteccia venga alterata da un evento distruttivo precoce (primo trimestre). Un'altra teoria sostiene che il meccanismo alterato che genera l'anomalia si verifichi nella formazione di una porzione della matrice embrionale o nella migrazione di neuroblasti primitivi; il reperto di mutazioni del gene *EMX2* in pazienti con la forma a labbra aperte supporta l'ultima ipotesi.

#### Lissencefalia

La lissencefalia (cervello liscio) si riferisce all'aspetto esteriore della corteccia cerebrale in quei difetti in cui un'aberrazione della migrazione neuronale porta a una superficie corticale relativamente liscia. Lo spettro completo di questa malattia comprende agiria (mancanza completa dei giri e dei solchi che caratterizzano la superficie della corteccia cerebrale) e pachigiria (giri e solchi presenti in maniera incompleta e molto superficiali). I giri e i solchi non si formano in questo difetto a causa della mancanza di forze attrattive corticali dovuta al mancato instaurarsi di sentieri validi per la crescita assonale e per la migrazione cellulare. Sono stati identificati almeno 2 tipi di lissencefalia: lissencefalia classica e lissencefalia cobblestone (a ciottolato). La distinzione si basa sull'aspetto esterno della corteccia cerebrale, sulla istologia e per l'immagine che può risultare da neuroimaging.

*Lissencefalia classica.* La lissencefalia classica si può avere in forma isolata e sembra causata da aberrazioni dei geni *Lis1* (lissencephaly 1) o doublecortin. Nella sindrome di Miller-Dieker può essere in combinazione con alterazioni di caratteristiche somatiche e delezioni in *Lis1*. Si può avere lissencefalia in associazione con ipoplasia cerebellare. L'associazione di lissencefalia con ipoplasia cerebellare rappresenta una malformazione a sé stante sia da un punto di vista genetico che clinico rispetto alle altre forme. L'ipoplasia cerebellare è abitualmente gravissima e anche il tronco encefalico può essere più piccolo della norma. I pazienti possono avere o meno una microcefalia associata. Questo disordine è spesso ereditato in modo autosomico recessivo (Fig. 13-45A,B).

*Lissencefalia cobblestone.* Le lissencefalie cobblestone sono difetti in cui si nota una configurazione liscia della corteccia, ma la distinzione dalla lissencefalia classica viene fatta basandosi sull'associazione clinica di anomalie oculari, muscolari, e idrocefalo progressivo. Il termi-

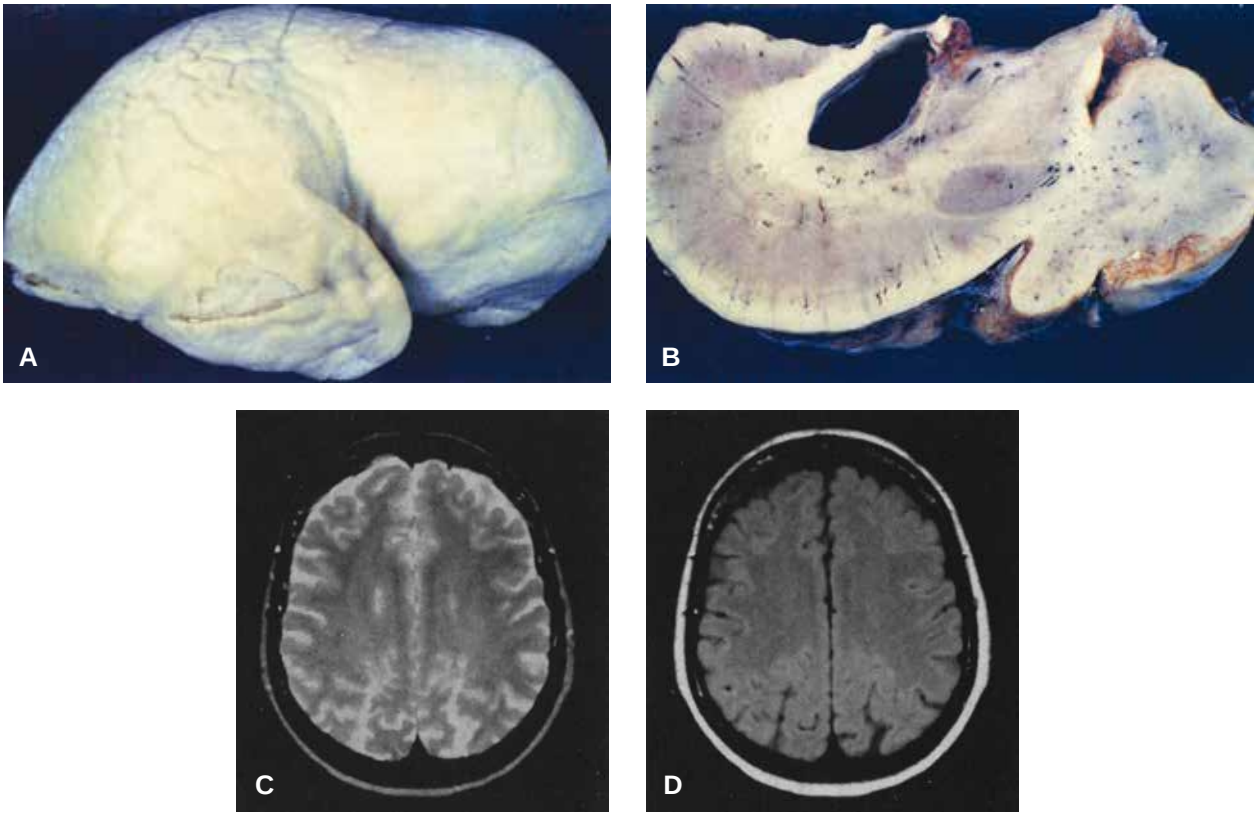



**Figura 13-45** ■ *A,B)* Lissencefalia di tipo I (di Miller-Dieker). La superficie corticale è liscia e agirica. (*Da* R.N. Rosenberg, Atlas of clinical neurology, Current Medicine Inc., 1998). *C,D)* Micropoligiria di una donna di 56 anni con epilessia focale farmacoresistente e storia di asfissia perinatale (esame con RM). (*Da* G. Macchi, Malattie del sistema nervoso, II edizione a cura di D. Minciacchi, G. Gainotti. In: P. Larizza (a cura di), Trattato di medicina interna, vol. X, Piccin Nuova Libraria, Padova, 2006).

ne "cobblestone" si riferisce all'aspetto della superficie corticale all'esame anatomopatologico. In questi disordini le cellule oltrepassano il loro limite di proliferazione e protrudono al di sopra della superficie della corteccia negli spazi subaracnoidei. Ciò risulta in un aspetto di strada acciottolato ("cobblestone") da cui il nome.

### *Polimicrogiria*

Polimicrogiria (molti piccoli giri) è un disordine spesso considerato un difetto di migrazione ma esistono teorie alternative al riguardo della sua patogenesi. L'aspetto microscopico della lesione è quello di troppi piccoli giri anormali. I giri possono essere bassi e separati da solchi poco profondi che possono essere associati con un chiaro aumento dello spessore corticale in neuroimaging. Le piccole molteplici circonvoluzioni possono non avere solchi interposti o i solchi possono essere collegati mediante fusione del sovrastante strato molecolare che può dare un aspetto liscio alla superficie cerebrale. L'interfaccia tra sostanza bianca e sostanza grigia non è netta, ma si presenta sfumata e spesso questo reperto serve come conferma della presenza di polimicrogiria (Fig. 13-45C,D).

### *Eterotopie*

Le eterotopie sono raccolte di neuroni di aspetto normale in una sede anomala probabilmente a seguito di un difetto di migrazione. Non è stato stabilito l'esatto meccanismo dell'aberrazione della migrazione sebbene siano state proposte varie ipotesi. Queste prospettano un danno delle fibre gliali radiali che rappresentano il substrato della migrazione cellulare, oppure una trasformazione prematura delle cellule radiali gliali in astrociti, o infine deficienza di molecole specifiche sulla superficie dei neuroblasti o delle cellule gliali radiali o dei recettori di queste molecole e proprio da ciò risulterebbe un disordine del normale processo di migrazione. Le eterotopie possono essere classificate per la loro localizzazione in subpiali, all'interno della sostanza bianca cerebrale, nella regione subependimale. La forma subependimale, si può considerare un disordine dominante X-linked associato a mutazioni del gene della filamina (Xq28). Le eterotopie leptomeningee (subpiali) spesso contengono astrociti frammisti a neuroni ectopici e possono somigliare a cicatrici gliali. Possono essere correlate a discontinuità della membrana limitante esterna e spesso sono associate a lissencefalia cobblestone. Queste eterotopie sono responsabili

dell'aspetto a ciottoli della superficie del cervello. Le eterotopie della sostanza bianca possono essere focali, subcorticali o diffuse. Possono causare distorsione dei ventricoli e possono essere associate a diminuzione della sostanza bianca nell'area circostante.

#### *Atassia cerebellare*

Le atassie sono patologie del cervelletto caratterizzate dalla mancanza di coordinamento muscolare. Una delle forme più frequenti di atassia ereditaria con meccanismo autosomico recessivo nell'uomo è l'atassia di Friederich caratterizzata da andatura impacciata, atassia degli arti superiori e disturbo dell'articolazione della parola. Le cause delle atassie sono molteplici e vanno da difetti nella migrazione delle cellule del Purkinje nella corteccia del cervelletto, alla loro mancata proliferazione o eccessiva degenerazione.

## *Difetti dello sviluppo e migrazione delle cellule delle creste neurali*

Difetti nello sviluppo e nella migrazione delle cellule delle creste neurali possono causare la formazione di alcuni tumori (ad esempio neuroblastoma, feocromocitoma, neurofibromatosi), e diverse sindromi. Tra queste ricordiamo la **sindrome di Charge** caratterizzata da ritardo dello sviluppo, coloboma, difetti cardiaci, atresia delle coane nasali, malformazioni dei genitali e dell'orecchio, la **sindrome di Waardenburg** caratterizzata da sordità e difetti della pigmentazione e la **sindrome di Di George** in cui i bambini che ne sono colpiti possono mostrare sviluppo incompleto del timo e delle ghiandole paratiroidi, malformazioni cardiache, fessurazione del palato e malformazioni della faringe, anomalie del viso, difficoltà di apprendimento e bassi livelli di calcio nel sangue. La sindrome di Di George è causata da una microdelezione del braccio lungo del cromosoma 22. Infine ricordiamo **displasie dentali** (anomalie della struttura e del colore dei denti) e displasie fronto-nasali con labioschisi e palatoschisi e albinismo.

## Bibliografia citata nel testo e letture consigliate


Briscoe J, Bennett G. Regulatory pathways linking progenitor patterning, cell fates and neurogenesis in the ventral neural tube. Novitch Phi Trans R Soc B 363, 57-70, 2008.

Copp AJ. Neurulation in the cranial region – normal and abnormal. J Anat 207, 623-635, 2005.

Faisal Y, Brand-Saberi B. The eventful somite: patterning, fate determination and cell division in the somite. Anat Embryol 211 (Suppl 1): S21-S30, 2006.

Kibar Z, Capra V, Gros P. Toward understanding the genetic basis of neural tube defects. Clin Genet 71, 295-310, 2007.

Leigh W, Maden M. The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. Developmental Biology 282, 1-13, 2005.

Levine AJ, Ali HB. Proposal of a model of mammalian neural induction. Developmental Biology 308, 247-256, 2007.

Limperopoulos C, du Plessis AJ. Disorders of cerebellar growth and development. Curr Opin Pediatr 18, 621-627, 2006.

Malaspina A, Turkheimer F. A review of the functional role and of the expression profile of retinoid signaling and of nuclear receptors in human spinal cord. Brain Research Bulletin 71, 437-446, 2007.

Mann F, Chauvet S, Rougon G. Semaphorins in development and adult brain: implication for neurological diseases. Progress in Neurobiology 82, 57-79, 2007.

McInnes RR, Michaud JL. Toward understanding the genetic basis of neural tube defects. Clin Genet 71, 295-310, 2007.

O'Rahilly R, Müller F. The development of the neural crest in the human. J Anat 211, 335-351, 2007.

Partanen J. FGF signalling pathways in development of the midbrain and anterior hindbrain. Journal of Neurochemistry 101, 1185-1193, 2007.

Sanchez-Camacho C, Rodriguez J, Ruiz JM, Trousse F, Bovolenta P. Morphogens as growth cone signalling molecole. Brain Research Reviews 49, 242-252, 2005.

Smith JL, Schoenwolf GC. Neurulation: coming to closure. Trends Neurosci 20, 510-517, 1997.

Toshihide Y, Mueller BK, Hata K. Neogenin and repulsive guidance molecule signaling in the central nervous system. Current Opinion in Neurobiology 17, 29-34, 2007.

Wilson SW, Houart C. Early steps in the development of the forebrain. Developmental Cell 6, 167-181, 2004.

14

# Lo sviluppo della faccia

Gianpaolo Papaccio

con la collaborazione di Virginia Tirino

## SVILUPPO DELLA FACCIA

### Brevi cenni di anatomia ed istologia

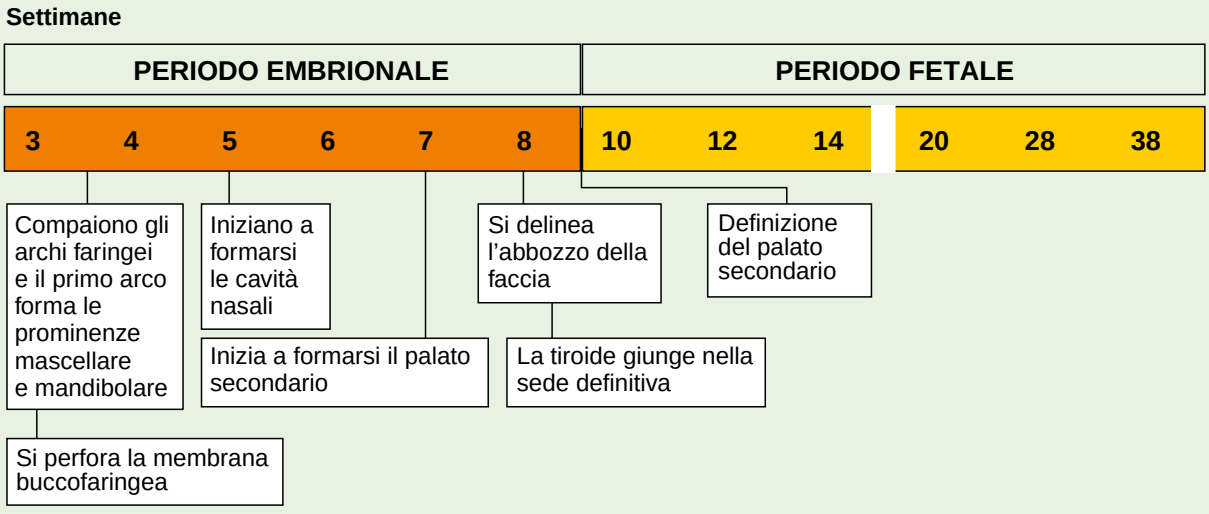
La faccia ed il collo rappresentano la porzione espressiva e di maggior impatto visivo per ciascuna persona. La faccia è costituita, a partire dal basso, dal mento, dalle labbra che racchiudono la bocca, dal filtro del labbro superiore, dal naso esterno, dalle guance, dagli zigomi, dagli occhi con ciglia e sopracciglia e dalla fronte, in parte ricoperta dai capelli. Ai lati della faccia vi sono i padiglioni auricolari. Al di sotto vi è il collo.

La bocca, o cavità orale, contiene denti e lingua e vi sboccano i condotti delle ghiandole salivari. Essa ha un pavimento ed un tetto, detto palato, che, posteriormente è costituito da sola mucosa con il velopendulo e l'ugola. Lateralmente la bocca è definita dalle guance e, posteriormente, si continua con l'orofaringe. Al davanti delle arcate dentarie vi è uno spazio virtuale, il vestibolo della bocca, che serve ai mammiferi per la suzione (Fig. 14-1). La bocca è considerata la prima parte dell'apparato digerente.

Il collo presenta numerose strutture, dalla colonna vertebrale sino alla tiroide (ghiandola endocrina di tipo follicolare), alla laringe ed all'esofago.

La complessità di tali strutture impedisce una trattazione anatomo-istologica sintetica completa, in quanto le strutture sono sia numerose sia molto diverse fra loro, per cui si rimanda a testi specifici. Lo sviluppo della faccia e del collo sono strettamente correlati a quello della bocca. Un ruolo centrale nella formazione di queste strutture è svolto dall'apparato faringeo.

**TABELLA CRONOLOGICA DEI PRINCIPALI PROCESSI DI SVILUPPO NELLA FORMAZIONE DELLA FACCIA**



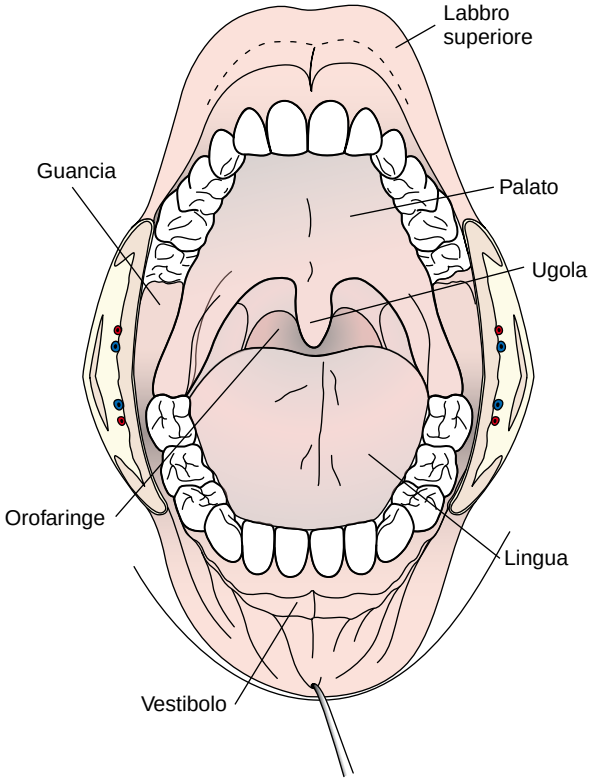



**Figura 14-1** ■ Struttura della bocca.

## Apparato faringeo

L'**apparato faringeo**, definito anche **branchiale**, va a formare numerosi e diversi organi e porzioni della testa e del collo, compresi il primo tratto dell'apparato digerente e di quello respiratorio.

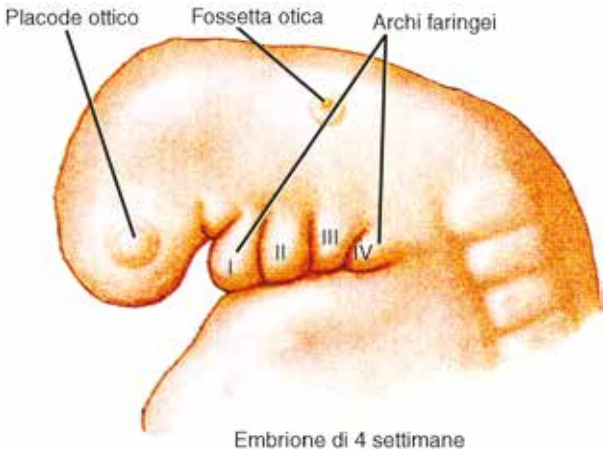



**Figura 14-2** ■ Archi branchiali o faringei. Gli archi sono indicati con i rispettivi nomi o con i numeri romani dal I al VI (tranne il V che regredisce immediatamente). Dall'esterno non sono tutti visibili. (*Da* G. Goglia, Embriologia umana, Piccin Nuova Libraria, Padova, 1997.)

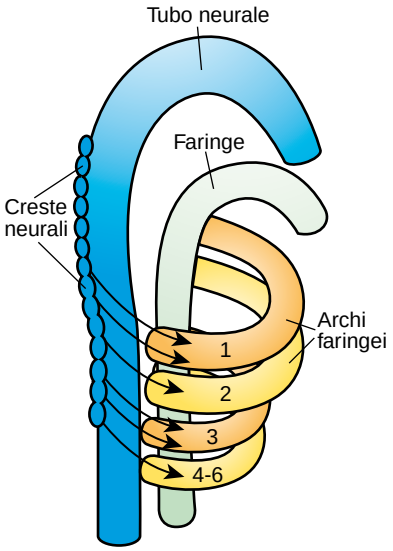



**Figura 14-3** ■ Schema della regione degli archi branchiali. Nell'immagine le frecce indicano la direzione di migrazione delle cellule delle creste neurali.

Tale "apparato" è costituito dalla sovrapposizione di anelli incompleti posteriormente, definiti **archi** (Figg. 14-2 e 14-3), ciascuno costituito da tutti e tre i foglietti embrionali definitivi (ectoderma di rivestimento esterno, mesoderma nella porzione centrale ed endoderma di rivestimento interno) e separati l'uno dall'altro in modo tale che il rivestimento ectodermico, passando fra un arco e l'altro vada a costituire, all'esterno, dei **solchi**, men-

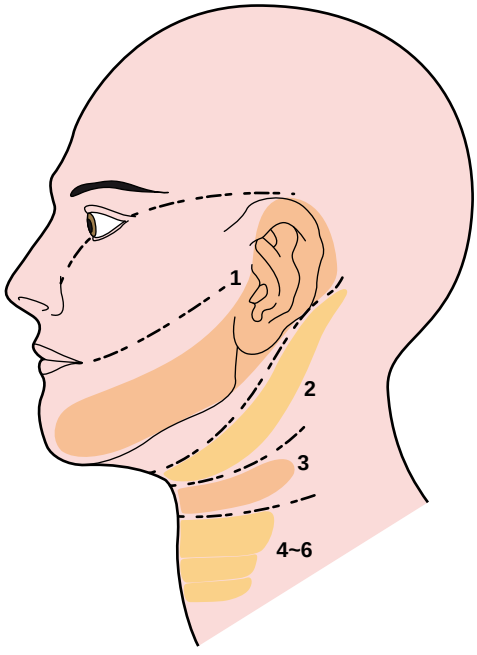



**Figura 14-4** ■ Localizzazione degli archi faringei rispetto alla struttura definitiva di faccia e collo.

tre quello endodermico, all'interno, delle vere e proprie **tasche**.

Le invaginazioni convergenti dei solchi e delle tasche produrranno la formazione delle **membrane branchiali** che sono piuttosto sottili, pur se, anche qui, ectoderma ed endoderma non verranno mai in contatto per la presenza di un sottile strato di mesoderma interposto.

In tal modo avremo, in totale, un numero di 5 archi (Fig. 14-2) denominati con i numeri romani I, II, III, IV e VI, in quanto il V arco regredisce.

Mentre i primi quattro archi sono visibili anche sulla superficie esterna dell'embrione già alla 4ª settimana, il V e il VI non sono visibili dall'esterno perché poco sviluppati.

## Archi faringei (o branchiali)

Ciascun arco faringeo è costituito da un asse di mesenchima, che in gran parte è di derivazione dalle creste neurali (Fig. 14-3), per cui la sua porzione mesenchimale è anche definita "ectomesenchima". Esso è rivestito, come già detto, all'esterno da ectoderma ed all'interno da endoderma (Fig. 14-4).

Così come gli archi, le **tasche** sono 5, laddove i **solchi** riconoscibili sono solo in numero di 4. L'aspetto a pieghe degli archi scomparirà a partire dal secondo mese, allorquando l'ectoderma del secondo arco si espanderà ricoprendo tutti gli altri e conferendo così al collo un aspetto liscio.

Le strutture che deriveranno da ciascun arco faringeo sono numerose. Qui di seguito ne riportiamo un sommario, rimandando alla Tabella 14-1 per un'elencazione completa.

- **I arco (o arco mandibolare).** Tale arco contiene un abbozzo cartilagineo, la **cartilagine del Meckel**. Questa cartilagine regredisce in gran parte, dando però origine, per ossificazione di tipo endocondrale, da entrambi i lati, a due ossicini dell'orecchio medio, il **martello** e l'**incudine** (la **staffa** deriverà dal II arco).

**TABELLA 14-1**

Derivati degli archi faringei con la rispettiva innervazione e vascolarizzazione

| Archi | Nervi | Muscoli | Strutture scheletriche | Legamenti | Arterie |
|---|---|---|---|---|---|
| **I (mandibolare)** | Trigemino (V NC, esclusa la branca oftalmica) | Muscoli della masticazione (*Temporale, Massetere, Pterigoideo mediale e laterale*)<br>Miloioideo e ventre anteriore del digastrico<br>Tensore del timpano<br>Tensore del velo palatino | Per ossificazione diretta mantellare:<br>– mandibola<br>– mascella<br>– palatini, zigomatico<br>Per ossificazione indiretta (endocondrale):<br>– martello<br>– incudine | Legamento anteriore del martello<br>Legamento sfenomandibolare | Mascellare |
| **II (ioideo)** | Faciale (VII NC) | Muscoli mimici facciali (*Buccinatore, Auricolare, Frontale, Platisma, Orbicolare della bocca ed Orbicolare dell'occhio*)<br>Stapedio<br>Stiloioideo<br>Ventre posteriore del digastrico | Per ossificazione indiretta (condrale):<br>– staffa<br>– processo stiloide<br>– piccolo corno dell'osso ioide<br>– parte superiore del corpo dell'osso ioide | Legamento stiloioideo | Ioidea e stapedia |
| **III** | Glossofaringeo (IX NC) | Stilofaringeo | Grande corno dell'osso ioide<br>Parte inferiore del corpo dell'osso ioide | | Carotide comune, radice della carotide interna |
| **IV e VI** | Ramo laringeo superiore del vago (X NC)<br>Ramo laringeo ricorrente del vago (X NC) | Cricotiroideo<br>Elevatore del velo palatino<br>Costrittore della faringe<br>Muscoli intrinseci della laringe<br>Muscoli striati dell'esofago | Cartilagini della laringe (*cartilagine tiroidea, cricoidea, aritenoidea, corniculata, cuneiforme*) | | Quarto arco aortico destro: arteria sottoclaveare<br>Quarto arco aortico sinistro: arco aortico<br>Sesto arco aortico destro: arteria polmonare<br>Sesto arco aortico sinistro: arteria polmonare e dotto arterioso |

NC = nervo cranico.

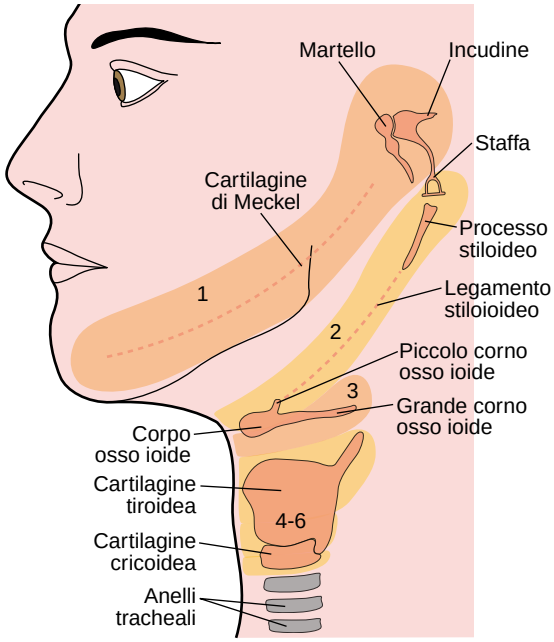



**Figura 14-5** ■ In arancio, strutture ossee e cartilaginee derivanti da ciascun arco faringeo.

Cellule mesenchimali che si portano intorno alla cartilagine del Meckel andranno incontro ad un processo di ossificazione di tipo diretto, definito "ossificazione mantellare" in quanto la cartilagine rappresenta il solo supporto, dando così origine alle ossa della faccia (mandibola e mascella principalmente, ma non soltanto) (Fig. 14-5). Dal mesenchima del I arco deriveranno inoltre diversi muscoli della faccia, fra i quali i muscoli masticatori. Il I arco è innervato dal nervo trigemino (V paio dei nervi cranici) ed è irrorato dal I arco aortico (ramificazioni terminali delle arterie mascellari).

- **II arco (o arco ioideo).** Esso contiene la **cartilagine del Reichert**, dalla quale deriveranno, per ossificazione endocondrale, l'ossicino della staffa dell'orecchio medio, il processo stiloideo, le piccole corna e la porzione superiore dell'osso ioide. Inoltre da esso deriveranno muscoli della faccia, in particolare i muscoli mimici ed alcuni muscoli del collo, da cellule ivi migrate dai miotomi dei primi sette somitomeri. Esso è innervato dal nervo faciale (VII paio dei nervi cranici) ed è irrorato da un ramo aortico (arterie stapedie) (Fig. 14-5).
- **III arco.** Darà origine, per ossificazione endocondrale, alle grandi corna ed a gran parte del corpo dell'osso ioide ed ai muscoli stilofaringei; è innervato dal nervo glossofaringeo (IX paio dei nervi cranici) ed è irrorato da un altro ramo aortico (carotidi comuni, radice delle carotidi interne) (Fig. 14-5).
- **IV arco e VI arco.** Daranno origine alle cartilagini della laringe e precisamente a quelle: tiroidea, cricoidea, epiglottica ed aritenoidea. Inoltre da tali archi deriveranno i muscoli faringei e laringei; sono innervati dal X paio dei nervi cranici o nervo vago (e precisamente dal ramo laringeo superiore per il IV e dal laringeo ricorrente per il VI) ed irrorati sempre da rami aortici (Fig. 14-5).

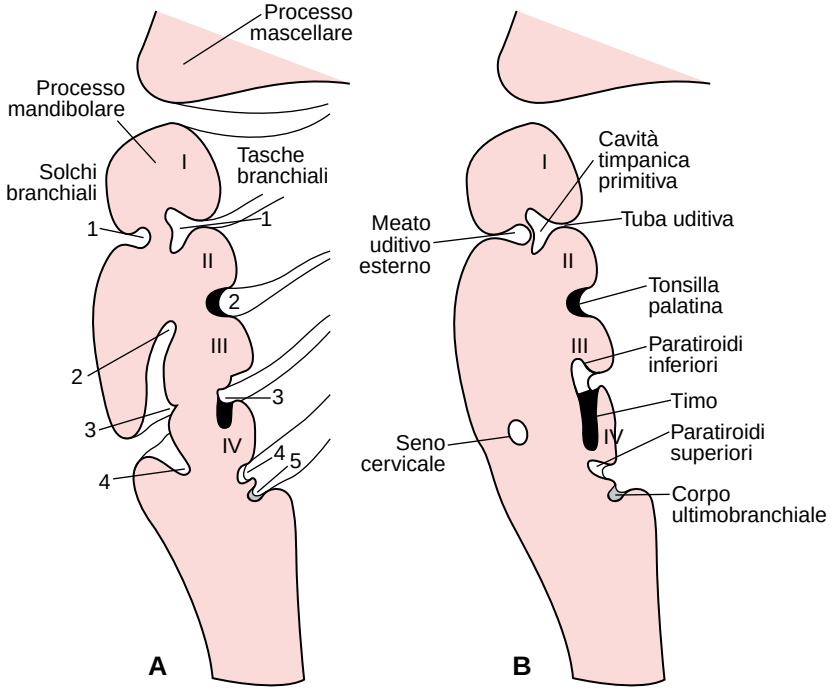



**Figura 14-6** ■ Riepilogo dei derivati dei solchi e delle tasche faringee.

## Solchi faringei

Essi sono quattro, sia a destra che a sinistra, sempre indicati con i numeri romani dal I al IV e si formano dall'ectoderma che si insinua tra gli archi (Fig. 14-6A).

Il primo solco forma il condotto uditivo esterno e la porzione esterna della membrana del timpano. Va anche detto che, al di sotto della sua porzione esterna giungono ammassi di cellule mesenchimali provenienti dai primi due archi faringei, dalle quali si svilupperà poi il padiglione auricolare (vedi Capitolo 19).

Gli altri solchi, II, III e IV, non daranno luogo a nessuna formazione, in quanto verranno completamente ricoperti dal II arco faringeo allorquando esso, durante la 6ª settimana, si accrescerà notevolmente e si sposterà in basso fondendosi con le porzioni esterne degli altri archi. Durante tale espansione si verrà a formare una cavità detta **seno cervicale**, che poi si oblitera.

## Tasche faringee

Le tasche faringee, site all'interno, rispetto ai solchi (che sono esterni), sono il risultato dell'invaginazione dell'endoderma dell'intestino faringeo fra gli archi. Ciascuna tasca è situata, sia a destra che a sinistra, in perfetta corrispondenza rispetto ai solchi ectodermici (Fig. 14-6B). Dalla I tasca deriveranno parti dell'orecchio medio e precisamente: la tuba uditiva o tromba di Eustachio, la parte media della membrana timpanica e gran parte della cavità timpanica (vedi anche Capitolo 19).

La II tasca è in gran parte obliterata e dà alloggiamento alla tonsilla palatina. La III tasca forma i maggiori abbozzi del timo e le paratiroidi inferiori; ciò in quanto, nella sua discesa verso la cavità mediastinica anteriore, il timo, anche a seguito degli spostamenti del cuore, porta con sé le paratiroidi che, nella loro posizione definitiva, diverranno inferiori rispetto a quelle che si origineranno dalla IV tasca.

La IV tasca è adiacente alla VI tasca. Dalla IV tasca origineranno le paratiroidi superiori insieme ad una massa timica che poi regredisce. Dalla VI tasca si origina il corpo ultimo branchiale, costituito da cellule provenienti dalle creste neurali ed ivi migrate. Tali cellule, successivamente si porteranno nella tiroide andando a formare le cellule C o parafollicolari, le quali producono l'ormone calcitonina.

## Membrane faringee

Le membrane faringee non daranno luogo a strutture dell'individuo adulto, ad eccezione della prima, la quale contribuisce soltanto alla formazione della membrana timpanica, insieme al mesenchima ed al primo solco ed alla prima tasca faringea (come precedentemente specificato).

## Formazione della lingua

La faccia interna degli archi faringei è rivestita dall'endoderma dell'intestino faringeo. In corrispondenza della porzione mediana posteriore degli archi faringei, verso la 4ª settimana di sviluppo, si osservano abbozzi che andranno a costituire le muscose di rivestimento della lingua (Figg. 14-7 e 14-8). A livello del I arco si osservano tre abbozzi, uno mediano, detto **tubercolo impari** e due laterali, addossati al primo, detti **tubercoli laterali**.

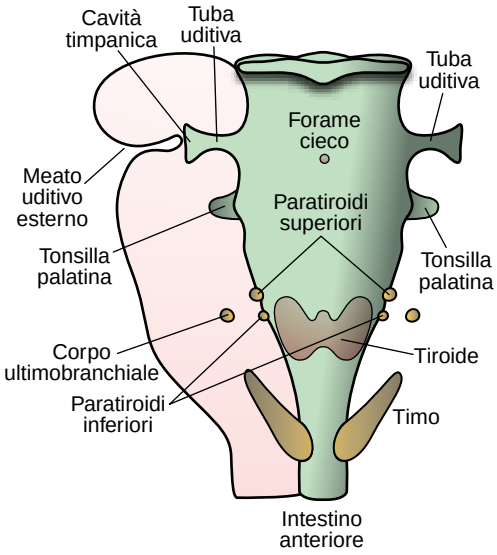



**Figura 14-7** ■ Area linguale: in verde la faccia ventrale dell'intestino faringeo. Vengono mostrati i derivati delle tasche branchiali.

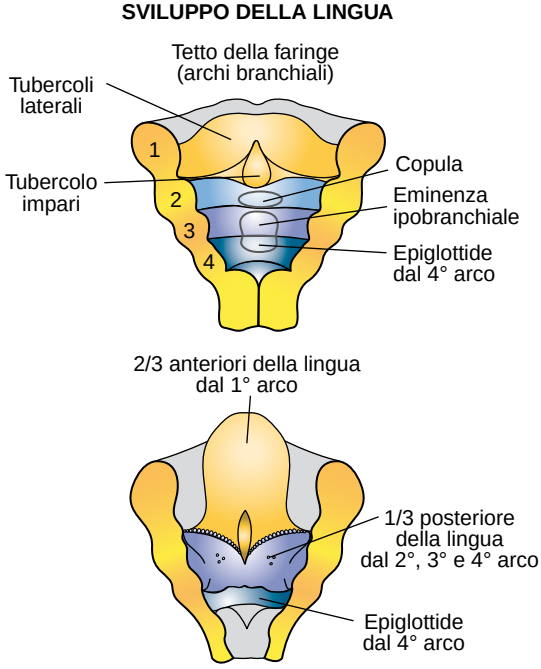



**Figura 14-8** ■ Formazione della lingua.

A questi primi 3 abbozzi se ne aggiunge un quarto, detto **copula**, nella regione mediana del II arco. Infine, un ultimo abbozzo è dato dall'**eminenza ipobranchiale**, che sporge in corrispondenza della confluenza del III e IV arco faringeo. Da tale eminenza originerà non solo il quinto ed ultimo abbozzo linguale, ma anche l'abbozzo dell'epiglottide.

Durante la 5ª settimana il tubercolo impari si fonde con quelli laterali, andando a formare gran parte (due terzi anteriori) della mucosa del corpo della lingua, laddove copula e parte dell'eminenza ipobranchiale andranno a formare la radice della lingua (o terzo posteriore). La linea di fusione fra i due tubercoli laterali è visibile come **solco mediano** nella lingua, laddove il "V" linguale segna la separazione fra corpo e radice della lingua (chiamato **solco terminale)**. Il punto di intersezione fra solco mediano e il V linguale è noto come **foramen caecum**, depressione che rappresenta il residuo del **dotto tireo-glosso**, che si oblitera (Fig. 14-7).

L'abbozzo endodermico della lingua è rinforzato da cellule mesenchimali provenienti dalle **creste neurali** e dai miotomi dei **somiti occipitali**. Le prime daranno origine al tessuto connettivo della mucosa della lingua, le seconde ai mioblasti che daranno origine alla muscolatura scheletrica della lingua, che si pone subito al di sotto della mucosa.

L'origine della mucosa della lingua da più abbozzi ne spiega la sua innervazione sensitiva; essa difatti è innervata da quattro nervi cranici: trigemino, faciale, glossofaringeo e vago. In particolare, le fibre che innervano i due terzi anteriori provengono dal ramo linguale della branca mandibolare del V o trigemino, il faciale o VII innerva solo i bottoni gustativi della parte orale della lingua, il terzo posteriore della lingua è innervato dal glossofaringeo o IX mentre il X o vago innerva una piccola area della lingua anteriormente all'epiglottide. La muscolatura motoria è invece innervata dal nervo ipoglosso o XII nervo cranico (ad eccezione del muscolo palatoglosso innervato da un ramo del vago).

### Formazione delle papille e dei bottoni gustativi della lingua

Le **papille linguali** compaiono alla fine dell'ottava settimana di sviluppo. Esse si sviluppano a seguito di una interazione epitelio-mesenchimale e contengono le terminazioni dei nervi afferenti che sono sensibili al tatto.

I **bottoni gustativi** si sviluppano dall'undicesima alla tredicesima settimana per un fenomeno di induzione reciproca tra le cellule epiteliali della lingua e le terminazioni nervose gustative provenienti dalla corda del timpano del IX e X nervo cranico. La maggior parte dei bottoni gustativi si sviluppa sulla superficie dorsale (palatale) della lingua, sul palato stesso e sulla superficie posteriore dell'epiglottide.

### Formazione della tiroide

Alla fine della 4ª settimana, a livello del pavimento dello stomodeo, una invaginazione di endoderma va a formare il **foramen caecum**, punto di separazione fra il I ed il II arco faringeo (Fig. 14-9). Al suo interno si invagina l'abbozzo tiroideo, che scende poi nel collo attraverso il dotto tireo-glosso, il quale poi si oblitera.

Successivamente, la tiroide continua nella sua discesa nel collo sino alla 7ª settimana, allorquando raggiunge la sua posizione definitiva dinanzi alla trachea e sotto la cartilagine cricoidea. La tiroide produce ormoni sin dal terzo mese di sviluppo. All'interno dell'abbozzo della tiroide migrano le cellule del corpo ultimo branchiale che provengono dalla VI tasca e che formano le cellule C.

### Formazione delle ghiandole salivari maggiori

Le **ghiandole salivari maggiori** iniziano a svilupparsi fra la sesta e la settima settimana di sviluppo come abbozzi epiteliali dello stomodeo. Le estremità di tali gemmazioni epiteliali si accrescono all'interno del sottostante mesenchima che andrà a costituire la componente stromale connettivale di tali ghiandole, di derivazione pertanto dalle creste neurali. Il parenchima secretorio originerà dalla proliferazione dell'epitelio della cavità orale.

Le ghiandole parotidi sono le prime a comparire. Esse si sviluppano da un abbozzo ectodermico in prossimità degli angoli dello stomodeo. La loro secrezione ha inizio alla diciottesima settimana.

Le ghiandole sottomandibolari appaiono verso la fine della sesta settimana; sono di derivazione endodermica (pavimento dello stomodeo) ed iniziano a secernere alla dodicesima settimana anche se la loro crescita continua dopo la nascita, allorquando si formano gli acini mucosi.

Le ghiandole sottolinguali si formano più tardivamente, a partire dall'ottava settimana, da abbozzi endodermici multipli a livello del pavimento dello stomodeo che si approfondano nel mesenchima dei solchi paralinguali.

## Lo sviluppo della faccia

VIDEO 5

Fino alla 4ª settimana di sviluppo, la testa e la faccia costituiscono approssimativamente metà dell'intera lunghezza dell'embrione. Nella regione della faccia le cellule delle **creste neurali** danno origine ai tessuti scheletrici e connettivali, ad eccezione dello smalto dentario (di origine ectodermica, vedi più avanti). Come già detto precedentemente, le cellule delle creste neurali formano la maggior parte dello scheletro osseo e cartilagineo del cranio e della faccia.

La faccia si sviluppa intorno alla cavità orale primitiva, a mezzo di "processi", che sono ammassi o rilievi di cellule mesenchimali rivestiti da ectoderma, provenienti prevalentemente dal primo arco faringeo e dal tetto della bocca primitiva o **stomodeo**. Tali abbozzi sono in numero di 5 e compaiono nel corso della 4ª settimana di sviluppo (Fig. 14-10):

- un **processo frontale o frontonasale**, impari e mediano, che si sviluppa dal tetto dello stomodeo;
- due **processi mandibolari**, pari e simmetrici, che si sviluppano dal primo arco faringeo e vanno a formare il pavimento dello stomodeo;

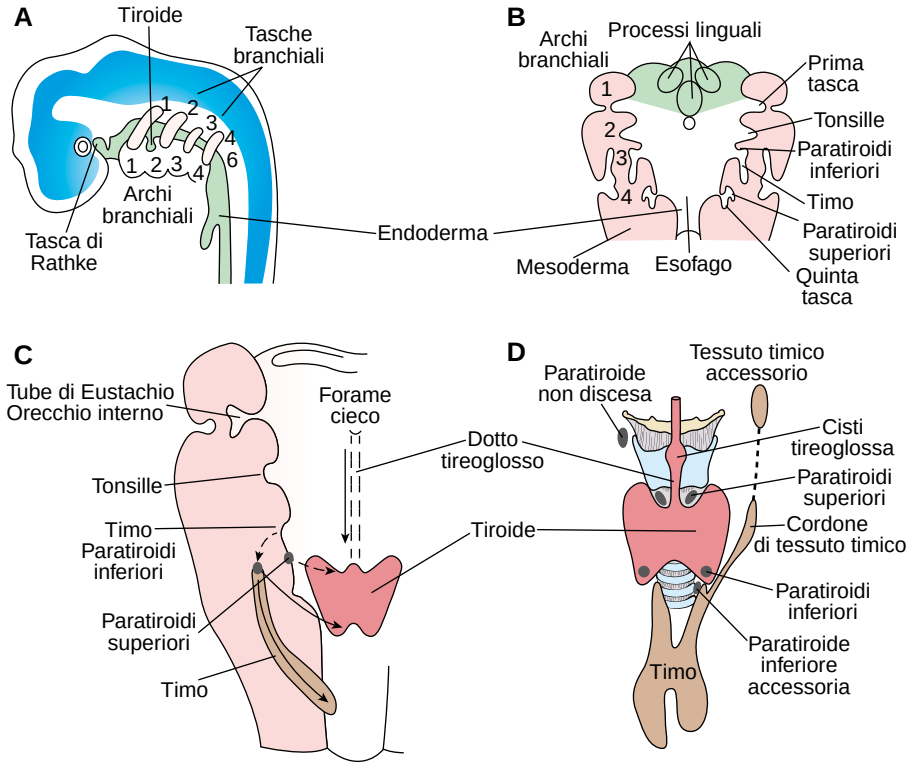



**Figura 14-9** ■ Derivati delle tasche branchiali ed origine della tiroide. *A)* Sezione sagittale. *B)* Sezione coronale (visione posteriore). *C)* Movimenti di migrazione di tiroide, timo e paratiroidi inferiori. *D)* Principali alterazioni morfogenetiche della migrazione di tiroide, timo e paratiroidi inferiori.

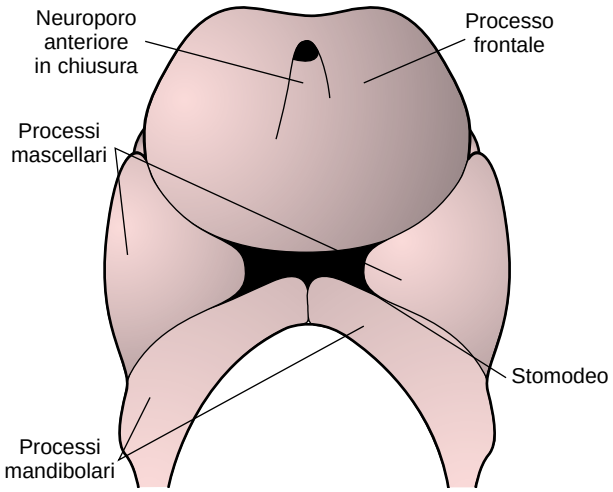



**Figura 14-10** ■ I processi facciali all'inizio della 4ª settimana.

- due **processi mascellari**, pari e simmetrici, che derivano dalla porzione laterale del primo arco faringeo e vanno a formare i lati dello stomodeo.

In tal modo la bocca primitiva presenta tutte le sue pareti. Alla fine della 4ª settimana, in corrispondenza del processo frontale, compaiono degli ispessimenti del foglietto ectodermico: i **placodi olfattivi**. Tali **placodi** vengono ispessiti sui bordi dal mesenchima sottostante e la loro forma è a "ferro di cavallo". In tal modo si formano da essi altri due abbozzi facciali: i **processi nasali**, che verranno poi distinti, su ciascun lato, in processo nasale **mediale** e **laterale**.

Una volta formati i processi nasali, i placodi olfattivi si trasformano in **fossette olfattive** che daranno poi origine all'epitelio olfattivo della mucosa nasale che contiene i neuroni olfattivi. Affinché si formi la faccia, a partire da tali processi, saranno necessari numerosi e complessi movimenti morfogenetici che dovranno necessariamente modificare la forma, le dimensioni ed i rapporti delle varie parti, determinando fusioni in precise regioni (Figg. 14-11 e 14-12). Sinteticamente possiamo dire che i principali movimenti con fusioni sono i seguenti:

- alla fine della 4ª settimana i due processi mandibolari si fondono sulla linea mediana andando a costituire il **mento** e l'**abbozzo del labbro inferiore**;
- alla fine della 6ª settimana i due processi nasali mediani si fondono dando origine alla porzione mediana o **massiccio mediano** della faccia. Lateralmente i processi nasali laterali formano le ali del naso ed il condotto naso-lacrimale. La regione superiore del massiccio mediano o base darà origine al setto nasale, mentre quella inferiore, detta **processo intermascellare**, si

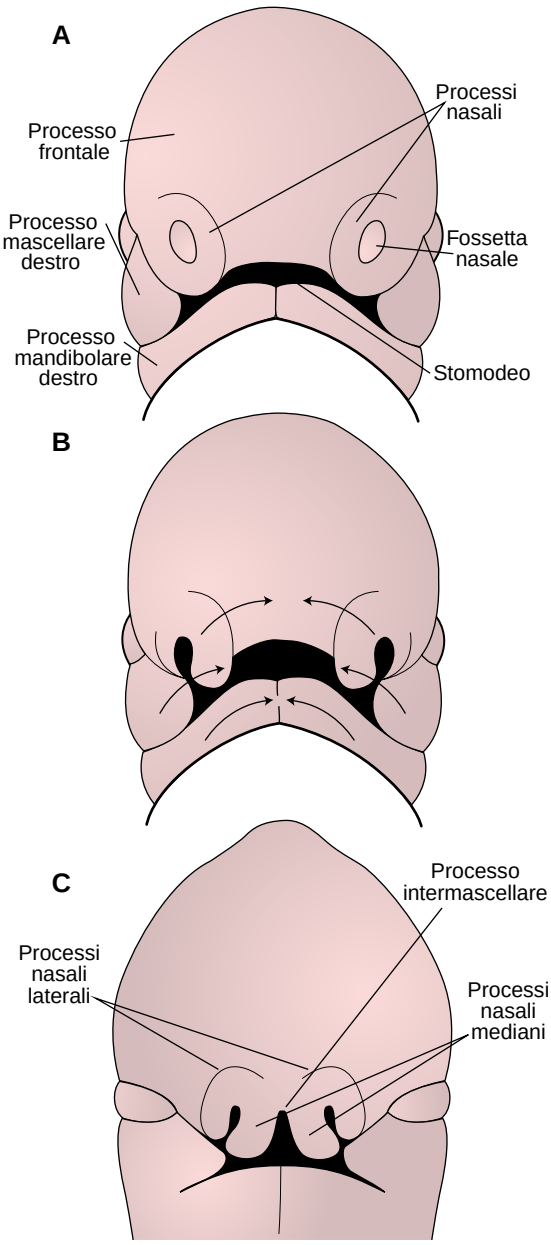



**Figura 14-11** ■ Sviluppo della faccia dalla 4ª alla 7ª settimana. In *B* le frecce indicano la direzione di spostamento dei processi indicati che porteranno alle fusioni descritte nel testo.

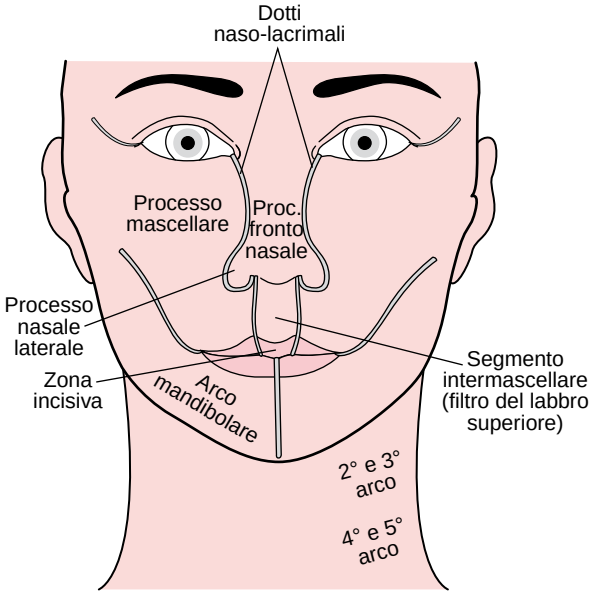



**Figura 14-12** ■ Linee di fusione della faccia definitiva.

suddivide in 3 porzioni che formeranno: quella esterna il **filtro del labbro superiore** (questo grazie alla proliferazione dei processi nasali mediali e di quello globulare derivante dalla fusione in basso dei due precedenti); quella intermedia la **zona incisiva** o premascellare, dove si formeranno i 4 incisivi superiori; quella interna darà origine al **palato primitivo**;

- i due processi mascellari daranno luogo a ben 3 diverse fusioni, così da creare una connessione fra i vari processi facciali. Entrambi si fondono con il processo intermascellare formando così l'**arco della mascella** ed il **labbro superiore**. Alla periferia esterna essi si fondono con i sottostanti processi mandibolari andando a ridurre l'apertura della bocca. I loro bordi superiori andranno a fondersi con i processi nasali laterali formando i cosiddetti **massicci laterali** che daranno luogo alle guance. Quest'ultima fusione, in profondità è incompleta per dare passaggio al **dotto naso-lacrimale** (che fa comunicare il sacco lacrimale con le cavità nasali).

Durante i processi di migrazione e fusione avverrà anche lo spostamento sul davanti verso la sede definitiva degli abbozzi degli occhi, i quali, in origine, sono situati ai lati della testa ed in fuori e delle orecchie, le quali, all'origine, sono situate molto in basso.

## Bocca primitiva

In origine la bocca primitiva o **stomodeo** è rivestita da ectoderma nella sua porzione anteriore e da endoderma nella sua regione più profonda, vicina all'intestino primitivo anteriore o faringeo. Inizialmente lo stomodeo è separato dall'intestino faringeo da una sottile membrana ecto-endodermica, la **membrana buccofaringea**. Fra i giorni 24° e 26°, questa si perfora, mettendo in comunicazione la cavità buccale con l'intestino faringeo. Ciò avrà, come conseguenza, una certa difficoltà, da questo momento, nel poter distinguere con certezza l'origine ectodermica o endodermica di alcune strutture, pur se, avendo la membrana faringea un andamento obliquo, possiamo affermare che tutto ciò che deriva dal tetto o volta sarà ectodermico (epitelio di rivestimento delle labbra, delle guance, delle gengive, smalto dei denti, parotidi) mentre il resto sarà di origine endodermica (per es., ghiandole sottomandibolari e sottolinguali).

La formazione del palato definitivo separerà la cavità orale propriamente detta dalle cavità nasali. La cavità orale, alla 6ª settimana, è delimitata dalle arcate mandibolari e mascellari, il cui epitelio prolifera formando due rigonfiamenti, le **creste labiali**. La porzione centrale di tali creste degenera formando la depressione detta solco labiale, il quale separa labbra e gengive andando a formare il **vestibolo della bocca**. Il solco gengivo-linguale separerà l'abbozzo delle gengive dalla lingua. La muscolatura labiale deriverà dal mesoderma del II arco (ioideo) e l'innervazione proverrà dal nervo faciale.

## Dal palato primitivo a quello definitivo

Il palato primitivo (Fig. 14-13) deriva da una proliferazione di mesenchima verso l'interno dello stomodeo. Tale processo, definito intermascellare, deriva a sua volta dal massiccio mediano della faccia ed inizialmente costituisce il pavimento della cavità nasale.

Nella zona più profonda di ciascuna fossa nasale esso si assottiglia per formare la **membrana oronasale**. La presenza della lingua (in posizione più elevata) per un certo tempo impedisce la formazione del palato definitivo.

La membrana oro-nasale, che separa in origine le cavità orale e nasale, a partire dal 40° giorno, si perfora determinando la comunicazione di tali cavità (perforazione del muro epiteliale del Fleichman o membrana di Hochstetter). Successivamente la discesa della lingua permetterà che dalla porzione mediale di ciascun processo mascellare possano proliferare verso l'interno della cavità buccale due lamine chiamate **processi palatini** che si porteranno verso il basso e poi medialmente l'una verso l'altra fino a fondersi tra loro (10ª settimana di sviluppo) sulla linea mediana (**rafe mediano**) e in avanti con il palato primitivo. Il punto di incontro tra il rafe mediano ed il palato primitivo delimita una piccola cavità chiamata **forame incisivo**, attraverso il quale passeranno i nervi nasopalatini. Il palato primitivo costituisce la porzione antero-mediale del palato secondario o definitivo, mentre la restante e maggiore porzione di esso è formato dai processi palatini. La porzione anteriore del palato secondario, compresa quella derivata dal palato primitivo, va incontro a processi di ossificazione diretta e dà origine al **palato duro**. La porzione posteriore del palato non ossifica e costituirà il **palato molle** e l'**ugola**.

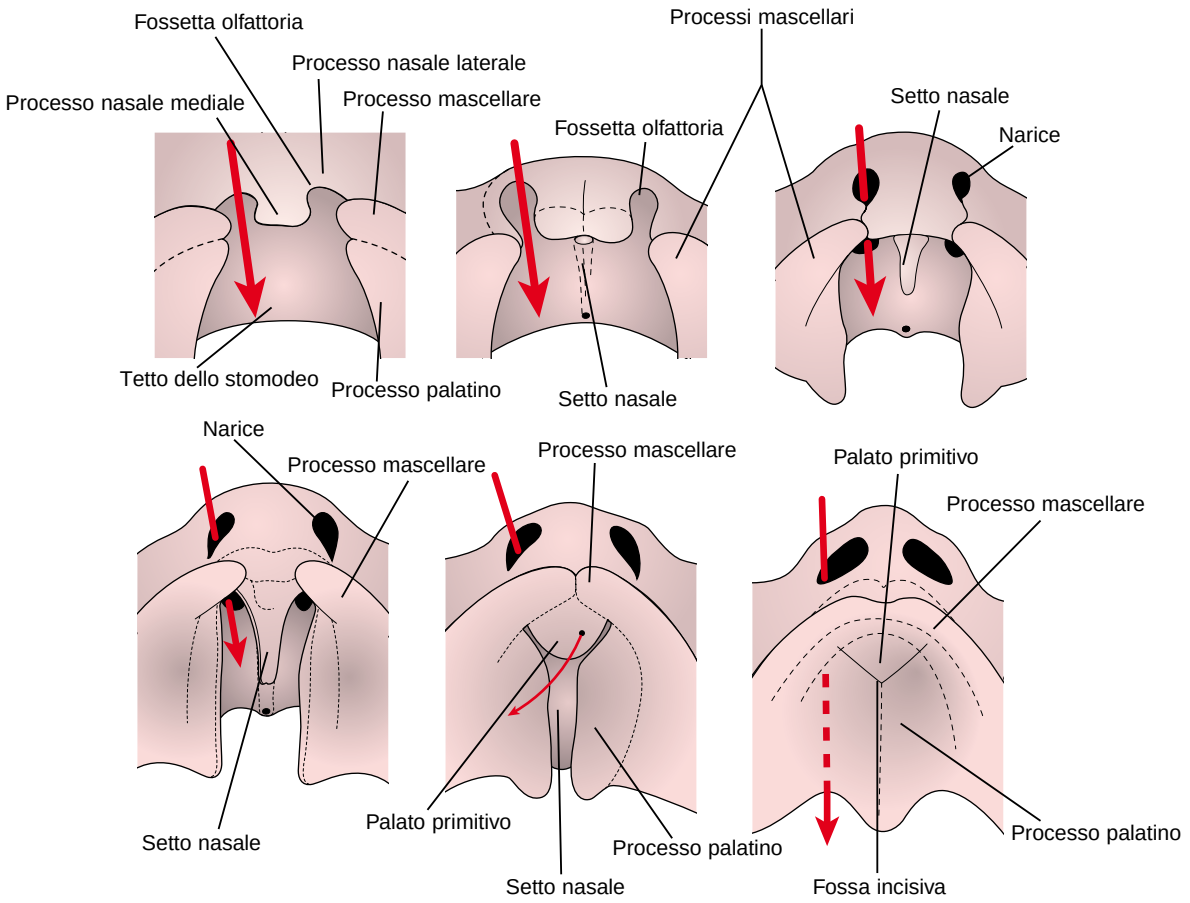



**Figura 14-13** ■ Formazione del palato primitivo e definitivo. (*Da* W.J. Hamilton, J.D. Boyd, H.W. Mossman, Embriologia umana, Piccin Nuova Libraria, Padova, 1977, modificata.)

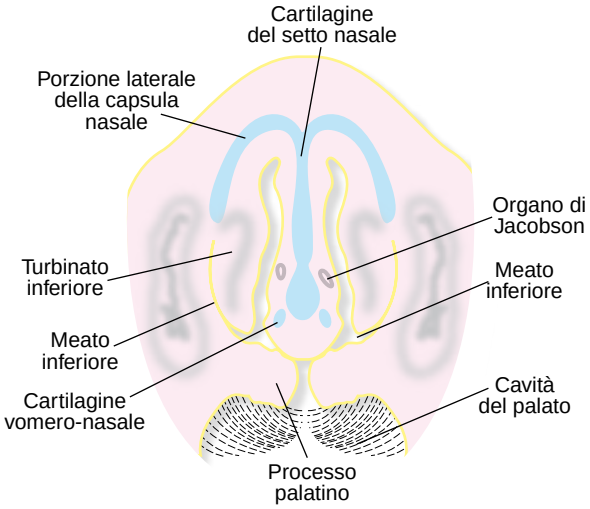



**Figura 14-14** ■ Cavità nasali in formazione.

## Le cavità nasali

Intorno ai placodi olfattivi si originano, come già detto, i processi nasali a forma di ferro di cavallo. I placodi si invaginano quindi verso l'interno, dando origine alle **cavità** o **sacchi nasali primitivi** (Fig. 14-14).

In un primo momento i sacchi nasali sono separati tra loro e dalla cavità buccale grazie alla membrana oronasale. Dopo la scomparsa di questa (7ª settimana) si forma un'unica cavità che, superiormente, è la **cavità nasale primitiva** ed inferiormente quella orale. Durante l'8ª e 9ª settimana di sviluppo dal tetto della cavità nasale origina e scende verso il basso il processo nasale detto **setto nasale**, il quale, alla 10ª settimana, si fonde con il palato secondario, separando in due le cavità nasali. Contemporaneamente la fusione (nel rafe) delle lamine palatine, separerà completamente la cavità orale da quelle nasali. Sul fondo delle cavità nasali si formeranno le **coane** definitive che faranno comunicare le cavità nasali con il faringe.

L'epitelio del tetto delle cavità nasali diviene quindi **epitelio olfattivo**. Sulle pareti laterali delle cavità nasali compaiono dei rilievi che formeranno i **cornetti nasali**.

## PROCESSI E MOLECOLE

### *I geni Hox*

Lo sviluppo degli archi faringei è tipicamente regolato dal codice costituito dall'espressione dei **geni *Hox*** (homeobox) e dal gene ***Otx2*** (orthodenticle homeobox 2), di cui si è ampiamente parlato nei precedenti capitoli (Figg. 14-15 e 14-16). Il primo arco viene popolato da cellule delle creste neurali originate dalla regione mesencefalica e dai rombomeri 1 e 2 (r1 e r2); a seguire le cellule delle creste provenienti dai rombomeri 3 e 7, popoleranno gli altri archi. Con l'eccezione del primo, ciascun arco è caratterizzato dall'espressione di un codice *Hox*, recentemente identificato anche nell'embrione umano. I geni *Hox* sono espressi sia dalle cellule della cresta neurale sia dall'ectoderma, mesoderma ed endoderma di questa regione (Fig. 14-16). Le cellule del primo arco non esprimono geni *Hox*, ma altri geni omeotici quali *Otx2* e *Dlx1-6* (distal-less X). Numerosi esperimenti effettuati su topi transgenici, che non hanno tuttavia avuto ancora conferma nell'uomo, hanno rivelato sia che lo sviluppo di ciascun arco dipende da interazioni fra tali geni e fattori morfogenetici espressi dall'ectoderma, mesoderma ed endoderma di questa regione, sia che la loro mancanza o difetto determina malformazioni. Inoltre, il destino specifico di ciascuna sottopopolazione di cellule delle creste neurali viene predeterminato, ossia definito, ancor prima che si verifichi la loro migrazione nel rispettivo arco faringeo.

In aggiunta, l'**acido retinoico** (**RA**), noto come potente teratogeno per il distretto cranio-facciale ed in specie

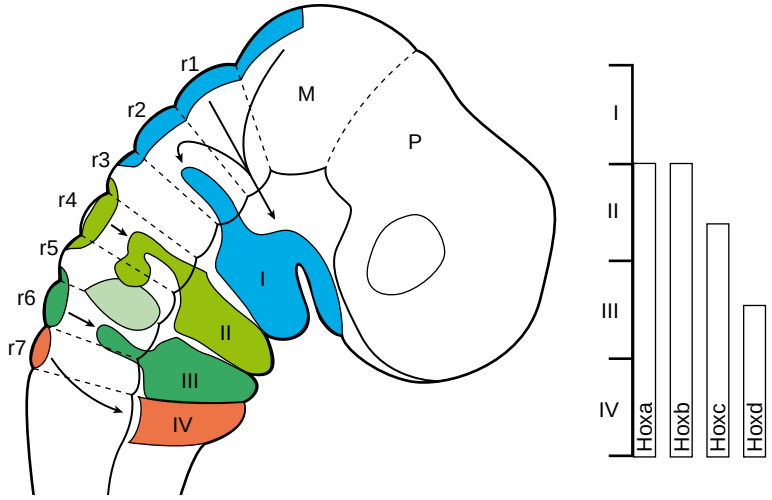



**Figura 14-15** ■ Direzioni di migrazione delle cellule delle creste neurali negli archi faringei e rispettivi rombomeri (r) in un embrione di pollo. A destra, l'espressione dei geni *Hox* negli archi (codice Hox). Notare che nell'arco I non vi è espressione di geni *Hox*.

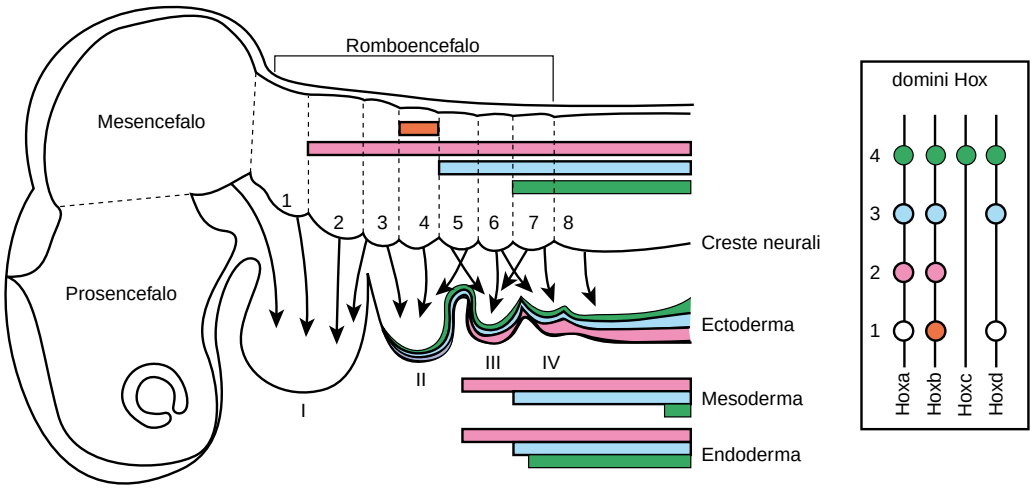



**Figura 14-16** ■ Espressione dei geni *Hox* nell'ectoderma, nel mesoderma, nell'endoderma e nelle creste neurali della regione degli archi faringei nell'embrione di pollo.

per i primi due archi faringei, esercita tale azione in quanto inibisce la migrazione delle cellule delle creste neurali con conseguente ipoplasia degli archi.

## ASPETTI CLINICI

### *Principali malformazioni*

Le malformazioni della faccia e del collo, insieme a quelle del cranio, costituiscono da sole circa un terzo di tutte le malformazioni congenite. Esse sono dovute sovente a difetti di migrazione delle cellule delle creste neurali. Tuttavia per la maggior parte di esse la genesi rimane multifattoriale.

#### *Apparato branchiale*

Il mancato o incompleto sviluppo dell'apparato branchiale producono una serie di anomalie che si manifestano alla nascita o nelle epoche successive della vita. Si tratta di malformazioni congenite localizzate all'interno del condotto uditivo esterno, a carico o nelle immediate vicinanze del padiglione auricolare o della porzione laterale del collo. I **seni**, le **cisti**, le **fistole** ed i residui cartilaginei sono le manifestazioni più comuni dei residui degli archi branchiali e sono generalmente osservabili sin dalla nascita o nella prima infanzia, mentre le cisti, poiché richiedono un certo periodo di tempo perché vengano distese dalle secrezioni che vi si accumulano, fanno generalmente la loro comparsa in un'età più avanzata. I residui del secondo arco branchiale sono molto più frequenti di quelli del primo; più rari quelli degli altri archi. Poiché l'apparato branchiale è pari, situato cioè in entrambi i lati del corpo dell'embrione, è comprensibile come queste manifestazioni siano spesso bilaterali (10-15% dei casi). La **sindrome del I arco** è caratterizzata da uno sviluppo insufficiente della mandibola (**micrognatìa**) e di tutte le altre strutture derivate dal I arco faringeo. Spesso si associa a **palatoschisi** ed a **macroglossìa**. Allorquando le cellule delle creste neurali mancano, si ha **agnatìa** ovvero mancanza della mandibola.

**Figura 14-17** ■ Immagine di fistola del collo.

Malformazioni riguardanti le tasche faringee possono determinare sindromi immunologiche per mancata maturazione del timo o assenza di ormoni paratiroidei. Può anche verificarsi la persistenza del seno cervicale con formazione di fistole (Fig. 14-17).

Molto più frequenti sono le cisti derivate dalla persistenza di residui di cellule tiroidee a livello del dotto tireoglosso.

#### *Lingua e processi facciali*

La lingua può essere sede di varie malformazioni che vanno dalla **macro-** (Fig. 14-18) alla **microglossìa**, alla **lingua bifida**.

I difetti di fusione fra i vari processi che vanno a formare la faccia ne possono determinare **fessure** o **schisi**, fra le quali, le più frequenti sono le **labioschisi,** dette anche **labbro leporino** (1 ogni 1.000 nati), e le **palatoschisi** o **labiopalatoschisi** (1 ogni 2.500 nati).

**Figura 14-18** ■ Macroglossìa.

**Figura 14-19** ■ Labioschisi monolaterale semplice. (Per gentile concessione del Prof. Gregorio Laino-SUN, Napoli).

Le labioschisi sono determinate dalla mancata confluenza fra il massiccio mediano ed il processo mascellare. Tale fessura o schisi può essere monolaterale o bilaterale e ancora parziale o totale. Inoltre la si definisce semplice allorquando interessi il solo palato e gengiva, e completa se giunge sino alle narici ed al forame incisivo.

Alcune forme di labbro leporino sono trasmesse geneticamente, laddove altre sono indotte da fattori ambientali (teratogeni quali la vitamina A).

Le palatoschisi si hanno per mancata fusione dei processi palatini, a causa di mancata o inadeguata proliferazione cellulare o inibizione della migrazione cellulare; più raramente per incapacità dei processi palatini a modificare direzione e fondersi. Come per il labbro leporino, anche le palatoschisi sono dovute a fattori genetici ovvero ambientali.

Sovente si hanno associazioni di ambedue i difetti (labiopalatoschisi) e con interessamento anche del processo alveolare della mandibola (**cheilognatoschisi**), in varie forme: monolaterale, bilaterale, fino alla forma totale bilaterale, nota come **gola di lupo** per l'aspetto impressionante (Figg. 14-19, 14-20, 14-21 e 14-22).

Malformazioni determinate da mancata confluenza di altri processi facciali sono ben più rare:

- **schisi facciale obliqua** o **coloboma** (mancata fusione fra mascellare e processo nasale laterale);
- **macrostomìa** (mancata fusione del mascellare con il mandibolare);
- **microstomìa** (all'opposto, aumentata confluenza fra i due processi);
- **schisi mediana del labbro inferiore** (per difetto di confluenza dei due processi mandibolari);
- **labbro leporino mediano** (mancata fusione dei processi nasali mediali).

**Figura 14-20** ■ Cheilognatoschisi monolaterale parziale. (Per gentile concessione prof. Gregorio Laino-SUN, Napoli.)

**Figura 14-21** ■ Cheilognatopalatoschisi monolaterale totale. (Per gentile concessione prof. Gregorio Laino-SUN, Napoli.)

## ODONTOGENESI

### Cenni di anatomia ed istologia

I denti, in numero di 20 nella dentizione decidua o di latte e di 32 in quella permanente, sono gli organi deputati alla masticazione. Essi sono infissi negli alveoli dentari, a livello delle ossa mascellare e mandibolare.

**Figura 14-22** ■ Cheilognatopalatoschisi bilaterale totale. (Per gentile concessione prof. Gregorio Laino-SUN, Napoli.)

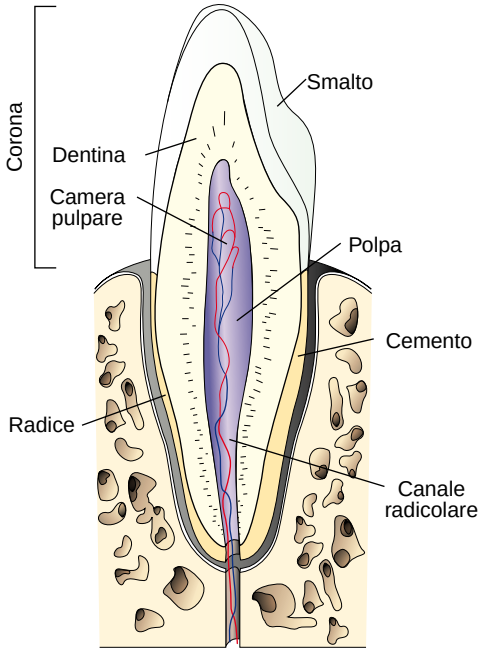



**Figura 14-23** ■ Disegno schematico di un dente incisivo.

In ciascun dente (Fig. 14-23) possiamo distinguere le seguenti porzioni:

- la **radice**, infissa nell'alveolo, di forma conoide, unica o multipla;
- la **corona**, parte visibile, con un versante occlusale uni o pluricuspidato;
- il **colletto**, porzione di passaggio fra la radice e la corona;
- la **camera pulpare**, cavità contenente la polpa dentaria scavata all'interno del dente e che comunica con il canale radicolare;
- il **canale radicolare**, attraversato da vasi e nervi.

La struttura istologica di ciascun dente è la seguente:

- un mantello di **smalto**, un tessuto duro a componente mineralizzata (cristalli di idrossiapatite), che riveste la corona;
- la **dentina**, variante dell'osso, sempre a struttura mineralizzata, che compone sia la radice che la corona di ciascun dente e racchiude la camera pulpare;
- il **cemento**, variante dell'osso, che ricopre la dentina a livello della radice di ciascun dente;
- la **polpa**, un connettivo mucoso di tipo mesenchimale, ricco di vasi e nervi, sito nella camera pulpare e nel canale radicolare e separato dalla dentina a mezzo di uno strato continuo di cellule chiamate odontoblasti.

I denti, a livello del colletto, sono avvolti dalla gengiva e si legano all'osso mediante il **legamento alveolodentale** o **legamento parodontale**.

## Sviluppo dei denti

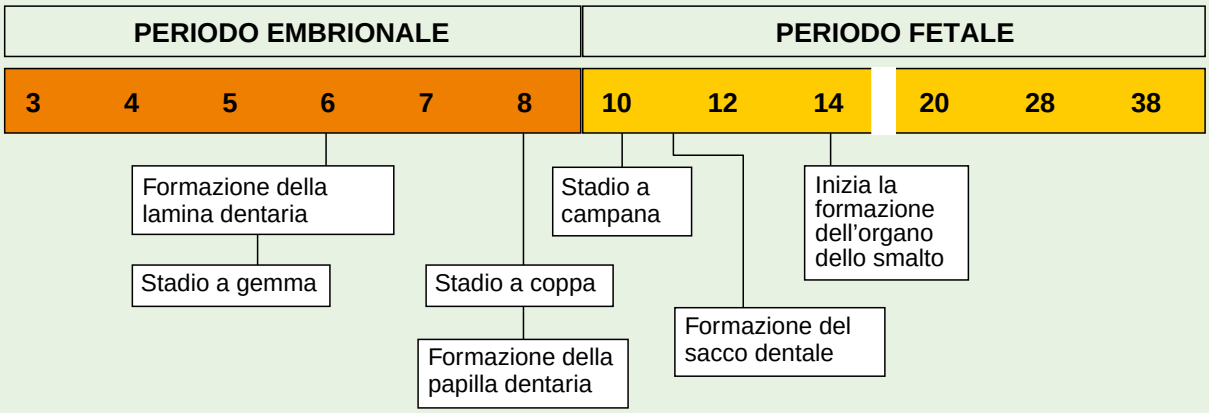
### Formazione delle gemme dentarie

Come già detto in altra parte del capitolo, le cellule delle creste neurali, migrando nella regione della testa e del collo, mescolandosi con le poche cellule mesodermiche ivi presenti, andranno a costituire l'"ectomesenchima", ossia l'insieme di mesenchima e neuroectoderma delle creste neurali, che differenziando darà vita a tutte le strutture connettivali del cranio, del collo e della faccia, compreso l'apparato dentario.

Durante la 6ª settimana di sviluppo, l'ectoderma che riveste la cavità orale è composto da un sottile epitelio a due o tre strati di cellule. Al di sotto di esso si trovano cellule ecto-mesenchimali. Queste stimolano la proliferazione delle cellule epiteliali sovrastanti. Nella regione ove si verranno a trovare i processi alveolari della mandibola e del mascellare, per la proliferazione di tale strato epiteliale, si verrà a costituire la cosiddetta **lamina dentaria**. Quest'ultima prenderà la forma di un ferro di cavallo e darà vita alle porzioni ectodermiche delle strutture dentarie. Nella lamina dentaria si formano quindi delle strutture ovoidali, dette **placodi ectodermici** che, proliferando all'interno del mesenchima sottostante, danno origine alle **gemme dentarie**. Le gemme saranno in numero di 52: venti per i denti decidui e trentadue per i denti permanenti. Gli abbozzi dei denti decidui compaiono tutti entro la fine del secondo mese di vita embrionale.

Le gemme dei denti permanenti che vanno a rimpiazzare i denti decidui origineranno "lingualmente" dai placodi ectodermici dei denti decidui, a partire da una struttura chiamata **lamina secondaria**. Il processo inizierà verso il quinto mese di vita intrauterina per i denti centrali e terminerà verso il decimo mese di vita dopo la nascita per i premolari. I denti che non hanno corrispondenti decidui (molari definitivi) derivano da un prolungamento distale della lamina dentale chiamato

## TABELLA CRONOLOGICA DEI PRINCIPALI PROCESSI DELL'ODONTOGENESI




**lamina accessoria**. Gli abbozzi dei primi molari permanenti compaiono verso il quinto mese di vita fetale, mentre quelli del secondo e del terzo si apprezzano dopo la nascita. Per quanto riguarda le gemme dei molari del giudizio, queste origineranno dalle gemme dei secondi molari permanenti all'età di 4 anni circa.

Insieme alla lamina dentaria, una seconda lamina prende vita dall'epitelio che riveste lo stomodeo, la **lamina vestibolare**. Questa si forma nelle immediate adiacenze della lamina dentale, sul lato vestibolare, si espande rapidamente e quindi degenera, formando un solco nell'epitelio orale che diviene il vestibolo della bocca ovvero quello spazio compreso tra i denti e le guance.

### I quattro stadi di formazione di un dente

Dopo la formazione dei placodi ectodermici si susseguiranno quattro stadi di sviluppo degli abbozzi dentari prima dell'eruzione dei denti. Questi stadi sono conosciuti come stadio di lamina, gemma, coppa e campana (Fig. 14-24).

Lo **stadio della lamina** (Fig. 14-25) è quello già descritto sopra ed è caratterizzato dall'ispessimento del foglietto epiteliale che ricopre la cavità orale e dalla proliferazione dello stesso con formazione della lamina dentaria.

Lo **stadio gemma** (Fig. 14-26) è la fase iniziale del definitivo sviluppo del dente. In questo stadio vi è una proliferazione della lamina che prende forma sferoidale all'interno del mesenchima. Questo stadio viene anche definito stadio iniziale o proliferativo. La fase finale di questo sviluppo proliferativo coincide con la formazione dell'**organo dello smalto** da parte delle strutture ectodermiche che cambiano conformazione e divengono da sferoidali concave. Questo cambiamento morfologico coincide con l'inizio della proliferazione del mesenchima degli abbozzi dentali. L'organo dello smalto (Fig. 14-27) è formato da quattro differenti tipologie cellulari:

1) l'**epitelio esterno** che copre l'intera struttura epiteliale;
2) l'**epitelio interno**, a stretto contatto con il mesenchima, che darà origine agli **ameloblasti**;

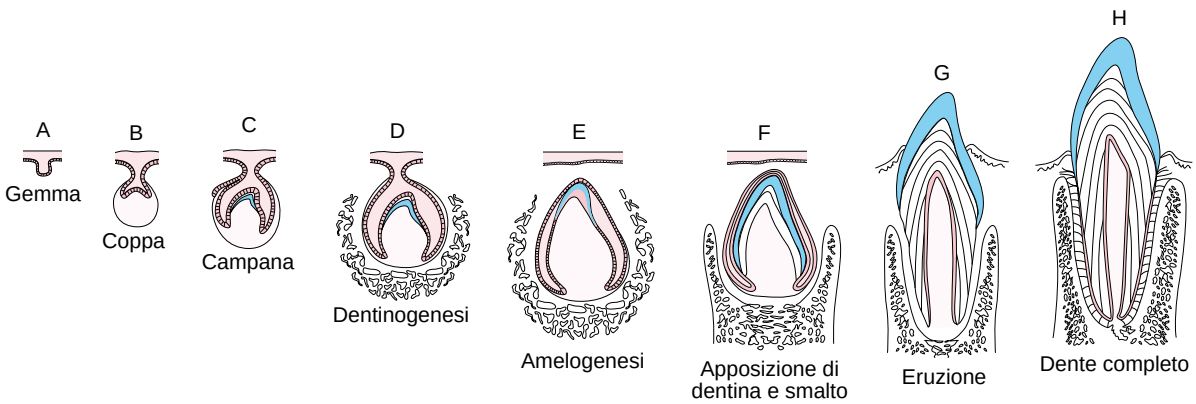



**Figura 14-24** ■ Schema riassuntivo delle fasi della formazione del dente.

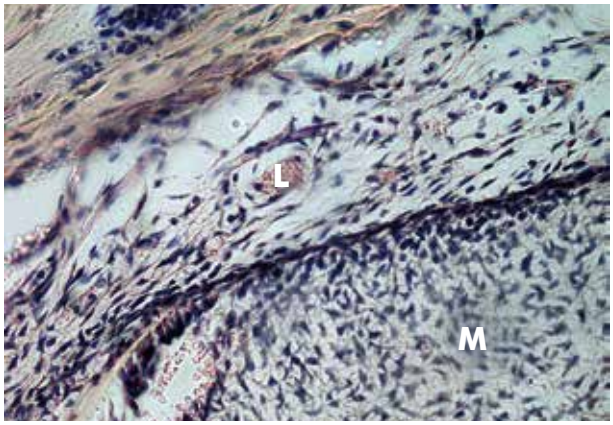



**Figura 14-25** ■ Formazione della lamina dentaria. L = lamina dentaria; M = mesenchima.

**Figura 14-26** ■ Stadio della gemma.

**Figura 14-27** ■ Organo dello smalto: strati di cellule. R = reticolo stellato; E = epitelio esterno; I = epitelio interno.

3) lo **strato intermedio**, a stretto contatto con lo strato epiteliale interno;
4) le cellule del **reticolo stellato** che riempiono la struttura della gemma residuata tra l'epitelio interno e l'epitelio esterno ed hanno una funzione trofica nei confronti dell'epitelio interno e degli ameloblasti.

Nella regione in cui l'epitelio esterno si porta verso l'interno, si viene a formare l'**ansa cervicale**. Tale struttura è di fondamentale importanza per la formazione della **guaina di Hertwig** (Fig. 14-28) quando, dopo il riassorbimento del reticolo stellato, lo strato epiteliale esterno ed interno verranno in contatto. Tale guaina, in associazione con il sacco follicolare, determinerà la formazione delle radici dei denti.

Le modifiche morfologiche delle strutture ectodermiche sopra descritte portano alla formazione del terzo stadio ovvero lo **stadio a cappa** o **coppa** (Fig. 14-29). In questa fase il mesenchima, oltre a proliferare, si organizza a formare la **papilla dentaria** nella concavità dell'or-

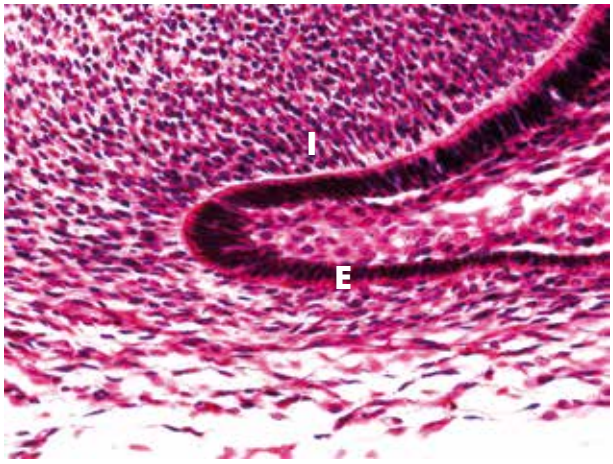



**Figura 14-28** ■ Lamina di Hertwig. E = epitelio esterno; I = epitelio interno.

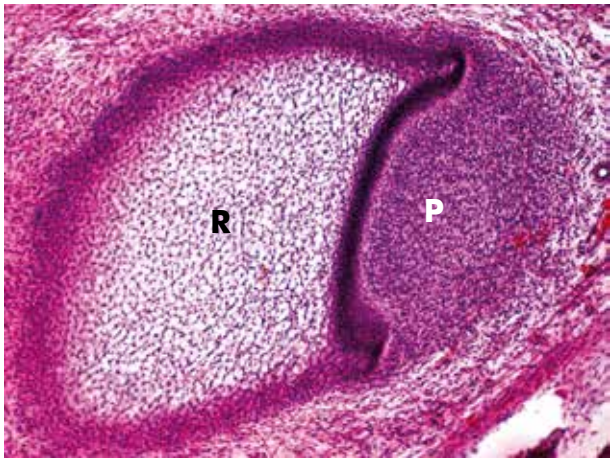



**Figura 14-29** ■ Stadio della coppa. R = reticolo stellato; P = papilla dentale.

gano dello smalto a ridosso dell'epitelio interno, struttura che darà vita alla **polpa dentaria**. Gli strati cellulari che avvolgono l'organo dello smalto e la papilla dentaria iniziano a proliferare formando il **sacco follicolare** o **follicolo dentario** che avvolgerà completamente gli abbozzi dentari.

Queste tre strutture: l'organo dello smalto, la papilla dentaria e il sacco follicolare, costituiscono il **germe dentario** che darà vita a tutte le strutture del dente e dei tessuti di supporto (**parodonto**). Le strutture ectodermiche daranno vita agli ameloblasti che producono lo **smalto**, la papilla formerà gli **odontoblasti** che producono la **dentina** e la **polpa**, il follicolo, in associazione alla guaina di Hertwig, il **cemento**, il **legamento parodontale** e la **cortex alveolare**.

A seguito della proliferazione dell'organo dello smalto e della papilla dentaria, si passa dallo stadio a coppa allo **stadio a campana** o stadio differenziativo (Fig. 14-30). Questo stadio è caratterizzato dall'acquisizione della struttura morfologica del dente, che in questa fase determinerà la propria forma, e dal differenziamento degli ameloblasti dallo strato epiteliale interno dell'organo dello smalto. Lo strato epiteliale esterno differenzierà in capillari atti a portare nutrimento all'organo dello smalto e soprattutto al reticolo stellato, fondamentale struttura di apporto nutritivo per le cellule dell'epitelio interno e degli ameloblasti. Subito dopo la formazione degli ameloblasti, dal mesenchima della papilla si differenzieranno gli odontoblasti, le cellule che produrranno la dentina. Una volta formati, gli odontoblasti andranno incontro ad un processo detto citodifferenziazione, per cui si polarizzeranno, ovvero sposteranno il nucleo in posizione basale, produrranno un prolungamento citoplasmatico ed inizieranno a produrre la matrice dentinale. Parallelamente, subito dopo la formazione del primo strato di dentina, anche gli ameloblasti andranno incontro al processo di citodifferenziazione, polarizzandosi e producendo un piccolo prolungamento citoplasmatico, il processo di Tomes, ed inizieranno a produrre la matrice dello smalto. Una volta avviato il processo produttivo da parte di queste cellule si osserverà la fase istodifferenziativa, durante la quale verranno formati i vari tessuti dentari, che acquisiranno le proprie caratteristiche architettoniche e funzionali avviando l'**amelogenesi** e la **dentinogenesi**.

Con l'avanzare della dentinogenesi le cellule della papilla dentaria risulteranno completamente circondate da una struttura dentinale, tranne che nella zona apicale formando il cosiddetto complesso pulpo-dentinale. Le cellule della papilla dentale inizieranno a differenziare in fibroblasti, neuroni ed endoteliociti, oltre ai già menzionati odontoblasti. In questa fase l'organo pulpare inizia a prendere origine ed a svolgere le proprie funzioni odontogeniche, sensitive, sensoriali e trofiche. Con l'eruzione del dente la polpa completa il proprio differenziamento lasciando al suo interno un cospicuo numero di cellule indifferenziate (staminali) atte a ripristinare l'equilibrio omeostatico cellulare in seguito a danni patogeni o senili. Il completamento della formazione del dente continua anche dopo l'eruzione dello stesso dall'alveolo dentario.

In seguito alla formazione della **corona**, sia nella porzione dentinale che in quella smaltea, gli strati epiteliali interno ed esterno dell'organo dello smalto risulteranno in stretto contatto, per la perdita del reticolo stellato. Nella zona dell'**ansa cervicale** si verrà a formare la **guaina o diaframma di Hertwig**. Questa struttura, crescendo verso il basso, determinerà la forma e la quantità delle radici ed in collaborazione con il sacco follicolare provvederà al differenziamento di cellule che porteranno alla formazione non solo di dentina e cemento (**cementoblasti**), ma anche del legamento parodontale e della cortex alveolare, ovvero di tutto ciò che un dente abbisogna per essere stabilizzato all'interno dell'osso. La formazione delle radici dentarie inizia solo dopo la formazione della corona poco prima dell'eruzione del dente.

Nella Tabella 14-2 è indicato nei dettagli lo sviluppo temporale della dentizione.

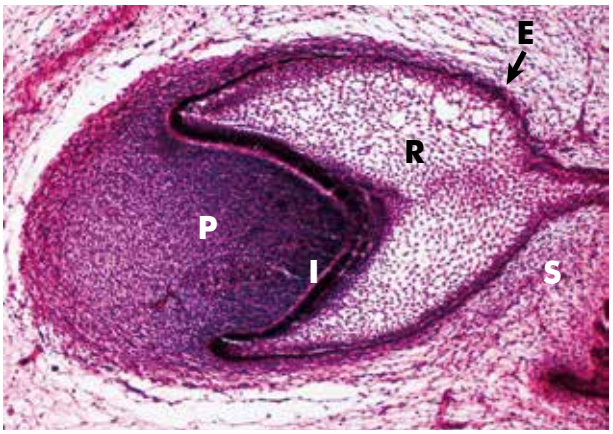



**Figura 14-30** ■ Stadio della campana. R = reticolo stellato; E = epitelio esterno; I = epitelio interno; P = papilla dentale; S = sacco follicolare.

## PROCESSI E MOLECOLE

### *Interazioni epitelio-mesenchima*

Quando l'epitelio ed il mesenchima della gemma dentaria, sia in uno stadio precoce che tardivo del differenziamento, vengono separati, continuano nel processo di proliferazione ma nessuna struttura dentaria riconoscibile viene formata. Infatti quando sviluppati indipendentemente, questi tessuti perdono la loro morfologia, sia che si trovino in uno stadio a cappa che a campana, così come perdono la capacità di formare smalto o dentina. La struttura epiteliale inizia a cheratinizzare, mentre quella mesenchimale forma un tessuto che ricorda la struttura del tessuto osseo. Ciò è importante per comprendere come l'interazione tra epitelio e mesenchima sia fondamentale per un corretto differenziamento e sviluppo dei tessuti dentari e come i due tessuti non possano procedere nello sviluppo se non in stretto rapporto.

**TABELLA 14-2**
Sviluppo temporale della dentizione

| Denti superiori (mascellari) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Denti decidui** | **Incisivi centrali** | **Incisivi laterali** | **Canini** | **Primo molare** | **Secondo molare** |
| **Calcificazione iniziale** | 14 sett. "in utero" | 16 sett. "in utero" | 17 sett. "in utero" | 15,5 sett. "in utero" | 19 sett. "in utero" |
| **Corona** | 1,5 mesi | 2,5 mesi | 9 mesi | 6 mesi | 11 mesi |
| **Radice** | 1,5 anni | 2 anni | 3,25 anni | 2,5 anni | 3 anni |
| **Denti inferiori (mandibolari)** | | | | | |
| **Calcificazione iniziale** | 14 sett. "in utero" | 16 sett. "in utero" | 17 sett. "in utero" | 15,5 sett. "in utero" | 18 sett. "in utero" |
| **Corona** | 2,5 mesi | 3 mesi | 9 mesi | 5,5 mesi | 10 mesi |
| **Radice** | 1,5 anni | 1,5 anni | 3,25 anni | 2,5 anni | 3 anni |

| Denti superiori (mascellari) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Denti permanenti** | **Incisivi centrali** | **Incisivi laterali** | **Canini** | **Primo premolare** | **Secondo premolare** | **Primo molare** | **Secondo molare** | **Terzo molare** |
| **Calcificazione iniziale** | 3-4 mesi | 10-12 mesi | 4-5 mesi | 1,5-1,75 anni | 2-2,25 anni | Alla nascita | 2,5-3 anni | 7-9 anni |
| **Corona** | 4-5 anni | 4-5 anni | 6-7 anni | 5-6 anni | 6-7 anni | 2,5-3 anni | 7-8 anni | 12-16 anni |
| **Radice** | 10 anni | 11 anni | 13-15 anni | 12-13 anni | 12-14 anni | 9-10 anni | 14-16 anni | 18-25 anni |
| **Denti inferiori (mandibolari)** | | | | | | | | |
| **Calcificazione iniziale** | 3-4 mesi | 3-4 mesi | 4-5 mesi | 1,5-2 anni | 2,25-2,5 anni | Alla nascita | 2,5-3 anni | 8-10 anni |
| **Corona** | 4-5 anni | 4-5 anni | 6-7 anni | 5-6 anni | 6-7 anni | 2,5-3 anni | 7-8 anni | 12-16 anni |
| **Radice** | 9 anni | 10 anni | 12-14 anni | 12-13 anni | 13-14 anni | 9-10 anni | 14-15 anni | 18-25 anni |

Per meglio comprendere quali siano i meccanismi alla base dello sviluppo dei denti, tessuti epiteliali di una gemma dentaria sono stati confrontati con tessuti mesenchimali di una gemma diversa ed impiantati in un ospite permissivo. Quando il mesenchima proveniente da una gemma che formerà un molare viene confrontato con un epitelio che formerà un incisivo, alla fine dell'ultimo stadio di sviluppo si formerà un molare. Quando il mesenchima di un molare viene confrontato con strutture epiteliali di lamina dentaria di una zona senza denti, si formerà un molare. Quando invece si combina l'epitelio di una gemma che darà vita ad un molare con il mesenchima di una zona destinata a non formare denti la struttura dentaria non si formerà. Questi semplici esperimenti ci permettono di capire che il mesenchima è fondamentale non solo nella morfogenesi degli elementi dentari ma anche nell'induzione dello sviluppo degli stessi: il mesenchima difatti esercita un'influenza "istruttiva" ovvero è anche in grado di istruire l'epitelio a formare smalto e non solo ad indurre la morfogenesi. Dall'altra parte l'epitelio non solo è fondamentale perché si formi il dente ma risulta anche permissivo cioè riceve influenze ambientali che ne inducono il differenziamento.

Sostituendo l'epitelio orale, ovvero l'epitelio proveniente dal primo arco branchiale, con un epitelio proveniente dal secondo arco branchiale, la formazione del dente non avviene. Questo significa che l'epitelio gioca un ruolo determinante in un'epoca molto precoce del differenziamento e che le cellule delle creste neurali non hanno un destino preprogrammato.

Riassumendo possiamo affermare che in uno stadio molto precoce della formazione della gemma dentaria, ovvero durante la formazione dei placodi dentali, l'epitelio induce il differenziamento del mesenchima programmandolo alla formazione di tessuti dentari, mentre in una seconda fase il mesenchima determina la formazione delle gemme dentarie e successivamente dei tessuti dentari. Possiamo dunque dividere i periodi "induttivi" dei tessuti dentari in due fasi: una prima fase, molto precoce, detta della predominanza epiteliale ed una seconda fase, tardiva, della dominanza mesenchimale.

## *Controllo molecolare dello sviluppo dentario*

Le interazioni molecolari che determinano l'induzione, la strutturazione e la morfologia dei tessuti dentari sono molto complesse. Almeno 300 geni e quattro vie di segnalazione sono implicate nello sviluppo dei denti. Più conosciuti sono i meccanismi che controllano lo sviluppo della corona, mentre solo recentemente cominciano ad essere identificati quelli che controllano lo sviluppo della radice/i.

Premettiamo che gli studi effettuati su roditori, nel caso dell'odontogenesi, non possono dare certezze per l'uomo, essendo differenti le dentizioni, per cui occorre sempre attendere conferme.

Tra i geni vanno ricordati i geni *Hox* e altri geni omeotici quali ***Lef1*** (lymphoid enhancer binding factor 1), ***Pitx2*** (paired-like homeodomain transcriptor factor 2), ***Otx2*** (orthodenticle homeobox 2), ***Barx1*** (BarH like (BARX) homeobox gene 1), ***Lhx6*** (LIM homeobox 6), ***Lhx7*** (LIM homeobox 7) e ***Pax9*** (paired box 9). Le quattro vie di segnalazione comprendono le interazioni di BMP, FGF, WNT e SHH con i loro recettori.

Per esempio, dopo la formazione del primo arco, ***Ptx2*** (paired-like homeodomain 2), un gene homeobox precoce, viene espresso nell'epitelio orale prima della formazione dei placodi dentali. Questa espressione viene regolata da segnali a breve raggio presenti nel mesenchima. Un'alterazione di tale fattore di trascrizione porta alla formazione della sindrome di Reiger, sindrome caratterizzata da ipoplasia o agenesia dentale. Questo fattore attiva la proliferazione epiteliale che porta alla formazione dei placodi dentali. Successivamente un fattore di crescita prodotto dalle cellule mesenchimali, ***FGF-8*** (fibroblast growth factor-8), viene secreto ed agisce inducendo sia un'ulteriore proliferazione dell'epitelio che del mesenchima portando alla formazione dello stadio di gemma. La proliferazione mesenchimale viene preceduta dalla compattazione dello stesso ad opera di **PAX9**. Animali mutati deficienti in **PAX9** manifestano un'agenesia completa degli elementi dentari. Probabilmente **PAX9** induce un'inibizione delle **BMP4** (bone morphogenetic protein 4) prodotte dall'epitelio, le quali sono presenti nella lamina dentaria in zone edentule (senza denti).

Un gene di fondamentale importanza nella regolazione dello sviluppo dentario, che pare possa essere addirittura implicato durante le fasi di induzione dei tessuti dentari, è ***Osr2*** (odd-skipped related 2). Sembrerebbe che tale gene possa regolare l'espressione di **MSX1** (muscle segment X1) e, di conseguenza, quella di **BMP4** nel mesenchima che prende parte alla formazione dentale. In alcuni esperimenti recentissimi effettuati su topi ***Osr2***$^{-}$ e topi ***Msx1***$^{-}$ si è visto che questi due geni agiscono antagonisticamente nella determinazione morfogenetica degli elementi dentari, controllando l'espressione e la distribuzione spaziale del mesenchima odontogenico. Il fatto che ***Osr2*** sia fondamentale nella formazione dentale nei topi ***Msx1***$^{-}$, e non il contrario, ed essendo **MSX1** regolatore di **BMP4**, fa supporre che **OSR2** giochi un ruolo fondamentale nell'attivazione/inattivazione della formazione dentale.

Nel 2003 un gruppo di ricercatori americani ha identificato un gene chiamato **Nfi-c** (nuclear factor i-c) che nei topi è responsabile della formazione della radice dei denti (vedi "Letture consigliate"). Questo gene codifica per un fattore di trascrizione che controlla l'espressione di diversi geni. Topolini in cui questo gene era stato eliminato sviluppavano denti formati solamente dalla corona e morivano dopo il periodo di allattamento per l'incapacità di masticare il cibo.

Pur se occorre molta cautela nel considerare trasferibili all'uomo esperimenti condotti su roditori o altri modelli animali specie per i denti, per chi voglia comunque approfondire i meccanismi molecolari sinora individuati che presiedono allo sviluppo dei denti si rimanda alla Figura 14-31, riepilogativa, ed alle "Letture consigliate".

## ASPETTI CLINICI

### *Principali malformazioni*

Numerosissime sono le alterazioni che possono colpire gli organi dentari. Si possono distinguere alterazioni qualita-

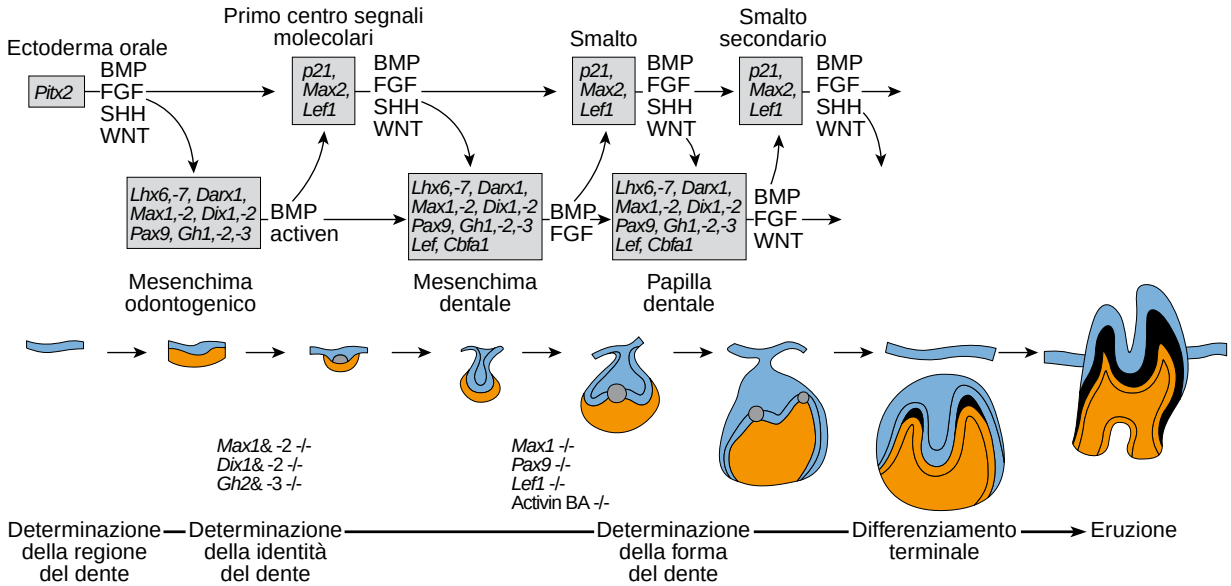



**Figura 14-31** ■ Figura riepilogativa dei principali geni coinvolti nell'odontogenesi (identificati nei roditori).

tive e quantitative. Tra le prime le più comuni sono sostanzialmente la **amelogenesi** e la **dentinogenesi imperfecta**. Seguono poi le alterazioni morfologiche anche loro molto comuni. Tra le alterazioni quantitative possiamo distinguere **oligondonzie**, **ipodonzie** e **anodonzie** e le **iperdonzie**. Le prime (oligondonzie, ipodonzie e anodonzie) consistono nella presenza di un numero inferiore o nell'assenza completa di denti. Nel caso delle anodonzie possiamo distinguere ablastodonzie se la serie colpita è solo quella dei denti permanenti oppure agenodonzia se ad essere colpita è la serie dei denti decidui. In questo caso, però, anche la serie permanente sarà affetta. Le iperdonzie sono costituite sostanzialmente da una presenza maggiore di elementi dentari. Queste ultime possono essere distinte, a secondo se l'elemento in eccesso sia di normale conformazione ovvero di conformazione anomala, in iperdonzia con supplementari o con soprannumerari.

### *Amelogenesi imperfecta*

Alterazione dello smalto (Fig. 14-32) dovuta ad un'alterata formazione della matrice organica seguita da un'alterazione anche della fase di mineralizzazione. Può essere geneticamente determinata o acquisita.

### *Dentinogenesi imperfecta*

Anche questa patologia può essere acquisita o congenita e riguarda il tessuto dentinale. Il tessuto risulta anomalo per qualità e quantità. Spesso si associa anche una mancanza di smalto dai denti determinata dalla debolezza del legame smalto-dentinale.

### *Discromia dentale*

Viene determinata da sostanze estranee incorporate nei tessuti dentali durante la formazione. Queste sostanze interferiscono con i normali processi di istogenesi portando alla formazione di tessuti alterati soprattutto dal punto di vista qualitativo. Sostanze come le tetracicline o il fluoro sono in grado di sostituirsi alla matrice mineralizzata formando delle classiche discromie che colorano il dente da marrone a grigio.

**Figura 14-32** ■ Amelogenesi imperfecta.

### *Alterazioni morfologiche*

Le alterazioni morfologiche possono colpire tutte le strutture del dente. Possiamo avere elementi dentari con corone più grandi o più piccole del normale; così come è possibile avere elementi dentari con più radici della norma. Casi rarissimi di anomalie morfologiche sono le fusioni di più elementi dentari. La fusione può avvenire in diversi siti ovvero a livello coronale, a livello radicolare o per tutta la lunghezza dell'elemento dentario. Per distinguere una fusione da un'alterazione morfologica vera e propria, un dente con più radici o con una corona più grande, basta valutare la presenza di una o più camere pulpari. Nel secondo caso si tratterà di fusione.

## Letture consigliate

### Sviluppo della faccia

d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A, Papaccio G. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. Cell Death Differ 14(6), 1162-1171, 2007.

Sperber SM, Dawid IB. barx1 is necessary for ectomesenchyme proliferation and osteochondroprogenitor condensation in the zebrafish pharyngeal arches. Dev Biol 321, 101-110, 2008.

Szabo-Rogers HL, Geetha-Loganathan P, Nimmagadda S, Fu KK, Richman JM. FGF signals from the nasal pit are necessary for normal facial morphogenesis. Dev Biol 318, 289-302, 2008.

Ten Cate AR. Oral histology. Development and structure. St. Louis, Mosby Inc., 1998.

### Odontogenesi

Avery JK. Oral development and histology. Thieme, Stuttgart-New York, 2002.

d'Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Laino L, Graziano A, Desiderio V, Laino G, Papaccio G. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. Eur Cell Mater 18, 75-83, 2009.

d'Aquino R, Tirino V, Desiderio V, Studer M, De Angelis GC, Laino L, De Rosa A, Di Nucci D, Martino S, Paino F, Sampaolesi M, Papaccio G. Human neural crest-derived postnatal cells exhibit remarkable embryonic attributes either in vitro or in vivo. European Cells & Materials 21, 304-316, 2011.

Giuliani A, Manescu A, Langer M, Rustichelli F, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Laino L, d'Aquino R, Tirino V, Papaccio G. Three years after transplants in human mandibles, histological and in-line holotomography revealed that stem cells regenerated a compact rather than a spongy bone: biological and clinical implications. Stem Cells Transl Med 2, 316-324, 2013.

Graziano A, d'Aquino R, Angelis MG, De Francesco F, Giordano A, Laino G, Piattelli A, Traini T, De Rosa A, Papaccio G. Scaffold's surface geometry significantly affects human stem cell bone tissue engineering. J Cell Physiol 214(1), 166-72, 2008.

Graziano A, d'Aquino R, Cusella-De Angelis MG, Laino G, Piattelli A, Pacifici M, De Rosa A, Papaccio G. Concave pit-containing scaffold surfaces improve stem cell-derived

osteoblast performance and lead to significant bone tissue formation. PloS One 2, e496, 2007.

Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Proto A, Giuliano MT, Pirozzi G, De Rosa A, Di Napoli D, Papaccio G. Human CD34+ stem cells produce bone nodules in vivo. Cell Proliferation 41, 1-11, 2008.

Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Pirozzi G, Naro F, Papaccio G. Dental pulp stem cells can be detected in aged humans: an useful source for living autologous fibrous bone tissue (LAB). J Bone Mineral Res 20, 1394-1402, 2005.

Laino G, Graziano A, d'Aquino R, Pirozzi G, Lanza V, Valiante S, De Rosa A, Naro F, Vivarelli E, Papaccio G. An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. J Cell Physiol 206, 693-701, 2006.

Miyoshi K, Nagata H, Horiguchi T, Abe K, Arie Wahyudi I, Baba Y, Harada H, Noma T. BMP2-induced gene profiling in dental epithelial cell line. J Med Invest 55, 216-26, 2008.

Paino F, Ricci G, De Rosa A, D'Aquino R, Laino L, Pirozzi G, Tirino V, Papaccio G. Ecto-mesenchymal stem cells from dental pulp are committed to differentiate into active melanocytes. Eur Cell Mater 20, 295-305, 2010.

Papaccio G, Graziano A, d'Aquino R, Graziano MF, Pirozzi G, Menditti D, De Rosa A, Carinci F, Laino G. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. J Cell Physiol 208, 319-325, 2006.

Steele-Perkins S. Bitz KG, Lyons GE et al. Essential role of NFL-C/CTF transcription replication in tooth root development. Mol Cell Biol 23, 1075-1084, 2003.

Tirino V, Paino F, d'Aquino R, Desiderio V, De Rosa A, Papaccio G. Methods for the identification, characterization and banking of human DPSCs: current strategies and perspectives. Stem Cells Rev Reports 7, 608-15, 2011.

Tirino V, Paino F, De Rosa A, Papaccio G. Identification, isolation, characterization, and banking of human dental pulp stem cells. Methods Mol Biol 879, 443-463, 2012.

Xu X, Han J, Ito Y, Bringas P Jr, Deng C, Chai Y. Ectodermal Smad4 and p38 MAPK are functionally redundant in mediating TGF-beta/BMP signaling during tooth and palate development. Dev Cell 15, 322-329, 2008.

Zhang Z, Lang Y, Chai Y, Jiang R. Antagonistic actions of Msx1 and Osr2 pattern mammalian teeth into a single row. Science 323, 1232-1234, 2009.

15

# Formazione degli apparati digerente e respiratorio

Gianpaolo Papaccio

con la collaborazione di Virginia Tirino

## FORMAZIONE DELL'APPARATO DIGERENTE

### Cenni di anatomia ed istologia

L'apparato digerente è un lungo canale che dalla bocca giunge fino all'ano (Fig. 15-1). In questo lungo percorso, il bolo alimentare attraversa visceri molto diversi tra loro. Inoltre, al canale alimentare sono annesse numerose ghiandole quali, ad esempio, il fegato ed il pancreas.

La **bocca** si apre nella parte inferiore della faccia e contiene i denti, infissi negli alveoli delle ossa mascellare e mandibolare, ai fini della masticazione, resa possibile dai muscoli e dall'articolazione temporo-mandibolare. Alla bocca segue la **faringe**, suddivisa in una orofaringe inferiormente ed in una rinofaringe superiormente, quindi l'**esofago**, un lungo condotto muscolo-membranoso che attraversa il muscolo diaframma, portandosi dal torace, passando al di dietro del cuore, sino all'addome, ove si continua, a mezzo della valvola cardiale nello **stomaco**, una sacca ove il cibo viene aggredito dai succhi gastrici acidi. Lo stomaco presenta due curvature (grande e piccola curvatura), ponendosi, a livello dell'epigastrio, dinanzi del pancreas. Esso termina con la valvola pilorica, al di là della quale ha inizio l'intestino, costituito, nell'Uomo, da due parti principali: l'**intestino tenue** e l'**intestino crasso**. L'intestino tenue è a sua volta costituito da un primo tratto detto **duodeno**, nella cui curvatura è adagiata la testa del pancreas e nella cui porzione terminale sboccano i dotti coledoco e pancreatico i quali versano ivi rispettivamente la bile (prodotta dal fegato) e gli enzimi digestivi del pancreas. Segue la parte del tenue denominata **digiuno**, costituita da numerose anse e quindi quella definita "ileo", la quale termina in corrispondenza della fossa iliaca destra, ove è presente la valvola ileo-cecale, che segna il passaggio fra l'intestino tenue e quello crasso. L'intestino crasso è costituito da 5 porzioni che si susseguono: la prima, che comunica con il tenue a mezzo della valvola ileo-cecale, è detto intestino cieco ed è costituito da una porzione dilatata che termina in basso a fondo cieco e presenta una piccola appendice definita vermiforme, sempre a fondo cieco, ricca di tessuto linfoide. Al cieco segue il colon ascendente che sale fino all'ipocondrio destro ove poi, con la flessura epatica, modifica l'orientamento divenendo colon trasverso, il quale si porta dall'ipocondrio destro sino all'ipocondrio di sinistra, ove si flette nuovamente (flessura splenica) e scende in basso come colon discendente. Questo poi si continua con una porzione che ha la grossolana forma di una S italica, definito colon sigmoideo, per terminarsi con una porzione rettilinea detta colon retto, cui segue il canale anale e l'orificio anale o ano vero e proprio.

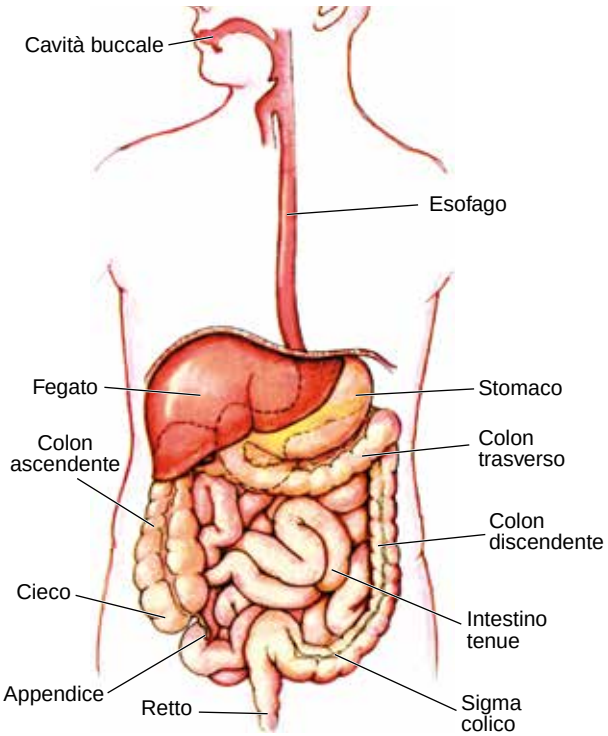



**Figura 15-1** Rappresentazione dell'apparato digerente. (*Da* G. Goglia, Anatomia umana, Piccin Nuova Libraria, 1999).

L'epitelio di rivestimento di tutto il canale alimentare è di origine endodermica, eccezion fatta per i tratti iniziale e terminale che sono costituiti, rispettivamente, dall'ectoderma dello **stomodeo** e del **proctodeo**. La parete del canale alimentare è formata da un epitelio di rivestimento che poggia su di un corion o **lamina propria** connettivale e, in qualche porzione, da fascetti di muscolatura liscia (muscularis mucosae): nell'insieme questi strati formano la **tonaca mucosa**. Al di sotto v'è il connettivo lasso della **sottomucosa**, spesso contenente ghiandole, rivestito da fasci di muscolatura liscia in due o più strati (**tonaca muscolare**) ed all'esterno una piccola lamina connettivale (**avventizia** o **sierosa** a seconda se l'organo è extra o intraperitoneale). Il rivestimento epiteliale, per la bocca, orofaringe ed esofago è costituito da un epitelio pavimentoso stratificato non cheratinizzato. A livello dello stomaco, l'epitelio diviene cilindrico semplice di tipo mucoide e cilindrico semplice con orletto a spazzola (assorbente) nell'intestino. I muscoli ed il connettivo derivano dal mesoderma laterale splancnico. La lamina propria contiene numerose ghiandole tubulari semplici nello stomaco e nel duodeno, ove i fondi sono ramificati e si continuano con quelle della sottomucosa ove sono presenti le ghiandole del Brunner (nel solo duodeno). Tutto l'intestino tenue presenta rilievi macroscopici definiti **villi intestinali**.

Le ghiandole di maggiori dimensioni della tonaca mucosa annesse all'apparato digerente sono: le **ghiandole salivari maggiori** (parotidi ad esempio) e minori che producono la saliva versata nel cavo orale, il **fegato** che produce la bile, albumina e ha molte altre funzioni, anche endocrine, il **pancreas**, anch'essa una ghiandola mista, esocrina ed endocrina.

## Sviluppo embrionale

### Regioni dell'intestino primitivo

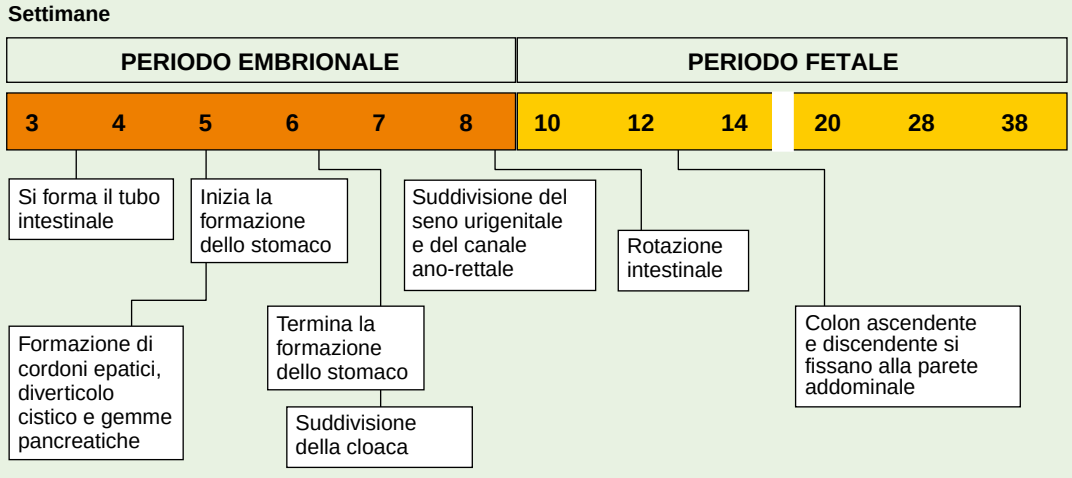
Come sopra riportato, l'epitelio di rivestimento dell'intestino è di origine endodermica eccezion fatta per i tratti iniziale e terminale che sono costituiti, rispettivamente, dall'ectoderma dello stomodeo e del proctodeo. I muscoli ed il connettivo derivano dal mesoderma laterale splancnico.

L'apparato digerente embrionale si abbozza sotto forma di tre regioni che, in direzione cranio-caudale, sono: lo stomodeo, l'**intestino primitivo** ed il proctodeo. Lo stomodeo è la bocca primitiva, mentre l'intestino primitivo è costituito da un tubicino che si porta dalla **membrana oro-faringea** sino alla **membrana cloacale** ed è distinto in tre porzioni (Fig. 15-2): l'**intestino anteriore**, **medio** e **posteriore**. Una possibile suddivisione fa capo alla vascolarizzazione: è detto anteriore tutto l'intestino vascolarizzato dall'**arteria celiaca**, è definito medio quello irrorato dall'**arteria mesenterica superiore**, laddove è detto posteriore quello nutrito dall'**arteria mesenterica inferiore**. L'intestino anteriore si porta dalla membrana oro-faringea sino al duodeno a livello degli abbozzi epato-pancreatici. Nella sua prima parte esso è detto anche **intestino faringeo** e rappresenta quella porzione che si porta dallo stomodeo sino all'origine dell'abbozzo tracheo-bronchiale (abbozzo che dà origine all'apparato respiratorio, vedi più avanti). L'intestino medio va dal duodeno inferiore sino ai primi due terzi del colon traverso. Da qui alla **membrana anale** si estende l'intestino posteriore.

VIDEO 6

L'intestino primitivo si forma allorquando, durante la 4ª settimana di sviluppo, i ripiegamenti cefalo-caudale e laterali fanno assumere all'embrione una forma cilindrica e fanno sì che circa i 2/3 prossimali della parete del sacco vitellino vengano incorporati nell'intestino primitivo, per cui questo sarà formato anche da endoderma extraembrionale. Durante lo sviluppo, l'intestino medio resterà in comunicazione con il sacco vitellino mediante il **dotto vitellino** e quello posteriore con l'**allantoide**: quando il dotto vitellino e l'allantoide verranno incorporati nel cordone ombelicale, tale comunicazione scomparirà (6ª settimana). Le due

**TABELLA CRONOLOGICA RIASSUNTIVA DELLO SVILUPPO DELL'APPARATO DIGERENTE**



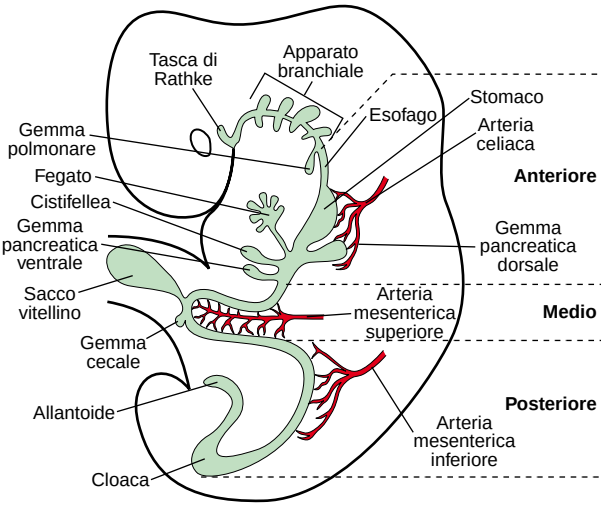



**Figura 15-2** ■ Parti dell'intestino primitivo e sua suddivisione in intestino anteriore, medio e posteriore.

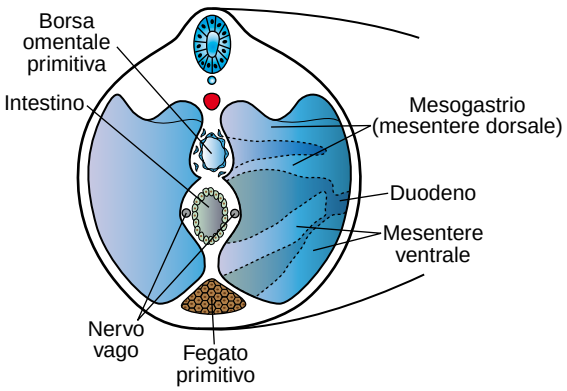



**Figura 15-3** ■ Rappresentazione schematica di alcuni mesenteri gastro-intestinali.

membrane di chiusura hanno tempi diversi di perforazione: quella oro-faringea scompare presto, alla metà della 4ª settimana; quella cloacale invece si suddivide in due porzioni: la **membrana urogenitale** e la **membrana anale**, che si perfora alla fine del secondo mese.

## Mesenteri

Alla 4ª settimana le pieghe embrionali determinano l'avvolgimento del tubo intestinale da parte della splancnopleura che formerà la parete muscolo-connettivale del tubo intestinale; i lembi restanti di questa, dopo tale avvolgimento, si accolleranno fra loro a formare il **mesentere dorsale** dell'intestino (Fig. 15-3). Tale meso ha il compito di tenere sospesi i visceri nella cavità addominale. La porzione addominale del celoma è detta **cavità peritoneale** per cui i visceri che vi si trovano all'interno sono definiti intraperitoneali. Altri organi, che successivamente vengono rivestiti dalla splancnopleura che li separa dalla cavità peritoneale, saranno definiti retro peritoneali (per esempio i reni, il pancreas e l'aorta discendente). Tale termine non è tuttavia sinonimo di "posteriore" al peritoneo, ma definisce solo che alcuni visceri sono al di fuori di tale cavità. Sicuramente il termine extraperitoneale sarebbe stato più adatto. Inoltre altri organi divengono "secondariamente" retroperitoneali: infatti, il colon ascendente ed il pancreas sono strutture inizialmente intraperitoneali, ma successivamente, per il riassorbimento del mesentere, divengono retroperitoneali.

Il mesentere prende inoltre vari nomi a seconda della regione e del viscere che tiene sospeso, per cui avremo un **mesogastrio**, **mesoduodeno**, **mesodigiuno** e così via. Nel caso dello stomaco esiste anche un **mesentere ventrale** che rappresenta il collegamento alla parete ventrale di stomaco e duodeno.

## Intestino anteriore

**Esofago.** Si porta dal diverticolo tracheale all'espansione dello stomaco. Dapprima è piuttosto corto, poi si allunga rapidamente grazie alla crescita del tronco embrionale. Con la formazione del diaframma, alla 7ª settimana, si suddivide in due porzioni: quella toracica e quella, più piccola, addominale. Il tessuto muscolare che lo compone è striato nella sua parte superiore, in quanto derivante dagli archi branchiali, mentre quello inferiore, liscio, deriva come il connettivo dal mesoderma splancnico.

**Stomaco.** Durante la 4ª settimana di sviluppo lo stomaco (Fig. 15-4) assume la forma di un fuso la cui porzione dorsale cresce maggiormente dando origine alla grande curvatura, mentre la parte ventrale si piega meno formando la piccola curvatura. Fra la 7ª e l'8ª settimana lo stomaco (Fig. 15-5) ruota di 90° intorno all'asse

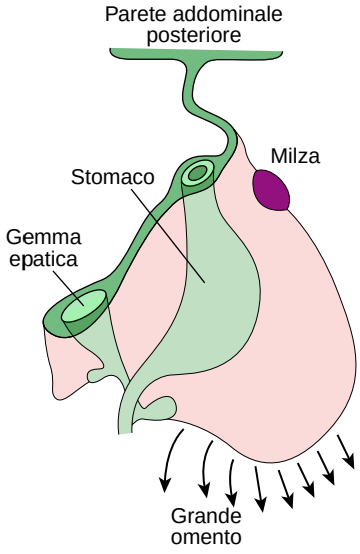



**Figura 15-4** ■ Veduta anteriore dello stomaco.

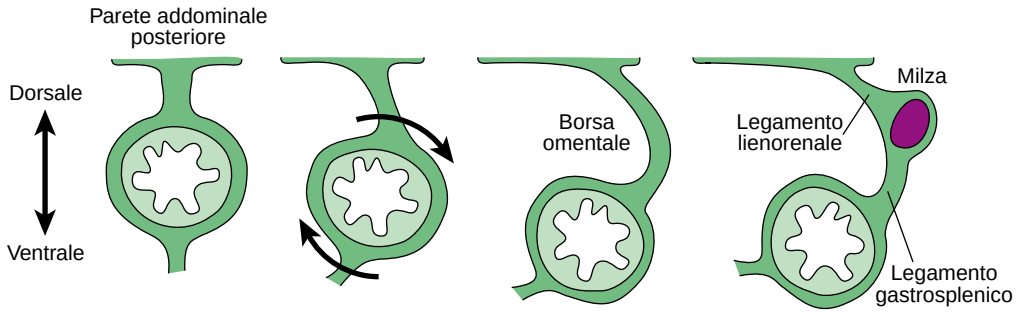



**Figura 15-5** ■ Rotazione dello stomaco.

centrale del corpo cosicché la grande curvatura si sposta a sinistra e la piccola a destra. Lo stomaco, inoltre, ruota anche intorno all'asse ventro-dorsale cosicché la grande curvatura si sposta in basso e la piccola in alto (Fig. 15-6). Il mesogastrio, durante questi movimenti, copre aree sempre maggiori per cui viene stimolato a proliferare. Tale proliferazione porta alla formazione di un vero e proprio mantello che scende nella cavità peritoneale: il **grande omento**. Allo stesso tempo la rotazione dello stomaco spinge il mesogastrio dorsale verso sinistra, determinando la formazione della **borsa omentale** e la conseguente suddivisione della cavità peritoneale in due cavità: la cavità formata della stessa borsa omentale o **piccola cavità peritoneale** o retro cavità degli epiploon e la **grande cavità peritoneale**. Queste due cavità comunicano mediante il forame epiploico. Con la formazione della milza, il mesentere dorsale dà origine al legamento lineo-renale ed al legamento lineo-gastrico. La crescita del fegato porta invece alla formazione del legamento falciforme e del piccolo omento dal mesentere ventrale (Fig. 15-7).

**Duodeno.** Comprende l'ultima porzione dell'intestino anteriore e la prima del medio. Le rotazioni dello stomaco lo spingono a destra ed a contatto con la parete del corpo per cui diviene un organo fisso, secondariamente retro-peritoneale. Durante la 4ª settimana sul duodeno compaiono gemme endodermiche che andranno a formare gli abbozzi di fegato, cistifellea, pancreas (due) e dei loro condotti escretori.

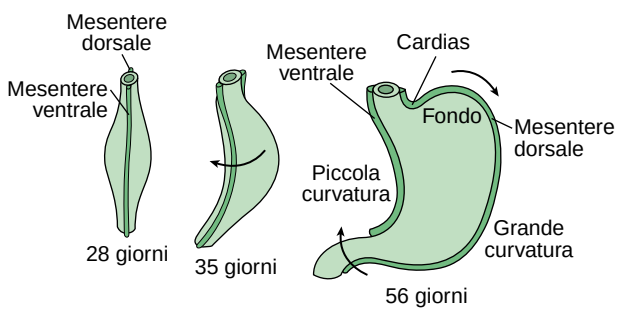



**Figura 15-6** ■ Rotazione delle pareti dello stomaco.

**Fegato e cistifellea.** Intorno al 22° giorno, dalla superficie del duodeno inizia a svilupparsi la **gemma epatica** (Fig. 15-8) che, dopo pochi giorni, darà luogo all'abbozzo o diverticolo epatico, che si sviluppa all'interno del mesentere ventrale dell'intestino. Dal diverticolo origineranno il parenchima epatico, i canalicoli biliari ed il dotto epatico, laddove lo stroma di supporto deriverà dalla splancnopleura.

Durante la vita embrionale, dalla 4ª settimana il fegato ha attività ematopoietica.

Intorno al 26° giorno, sul lato ventrale del duodeno compare la gemma che darà luogo al diverticolo cistico, da cui origineranno **cistifellea** e **dotto cistico**. Tale dotto, insieme a quello epatico, confluiranno in un dotto comune, il **coledoco**, le cui cellule proliferano, allungandolo ed allontanando gli abbozzi epatico e della cistifellea dal duodeno.

Alla 6ª settimana, il fegato entra in contatto con il setto trasverso giungendo sino al diaframma, la cui lamina inferiore dà origine al mesentere ventrale che avvolge il fegato in formazione. Al polo superiore il fegato non è ricoperto dal mesentere, per cui tale area, essendo a diretto contatto con il diaframma, viene detta area nuda del fegato. Lungo il suo contorno si forma il **legamento coronario**, che lo tiene strettamente adeso. In avanti si trova il **legamento falciforme** che deriva dalla sierosa del mesentere ventrale, che si lega alla porzione anteriore del corpo.

Il mesentere ventrale, che collega il fegato all'intestino, forma anche il **piccolo omento**, che, a sua volta, si suddivide nei **legamenti epato-gastrico** ed **epato-duodenale**, il quale ultimo contiene entro il suo spessore importanti strutture anatomiche quali: il dotto epatico, l'arteria epatica, la vena porta, i linfatici ed i nervi del fegato (Fig. 15-9).

**Pancreas.** Intorno al 26° giorno, verso la fine della 4ª settimana, sul duodeno, ma dorsalmente, compare il primo abbozzo del pancreas o **abbozzo dorsale**. Dopo pochi giorni, anteriormente, compare l'**abbozzo ventrale**. In ambedue gli abbozzi (Fig. 15-10) si formano i dotti escretori; quello ventrale o dotto principale del Wirsung, confluisce nel coledoco. Poco prima di sboccare nel duodeno, tale dotto con il coledoco formerà l'ampolla del Vater. Alla 6ª settimana, i due abbozzi si fondono for-

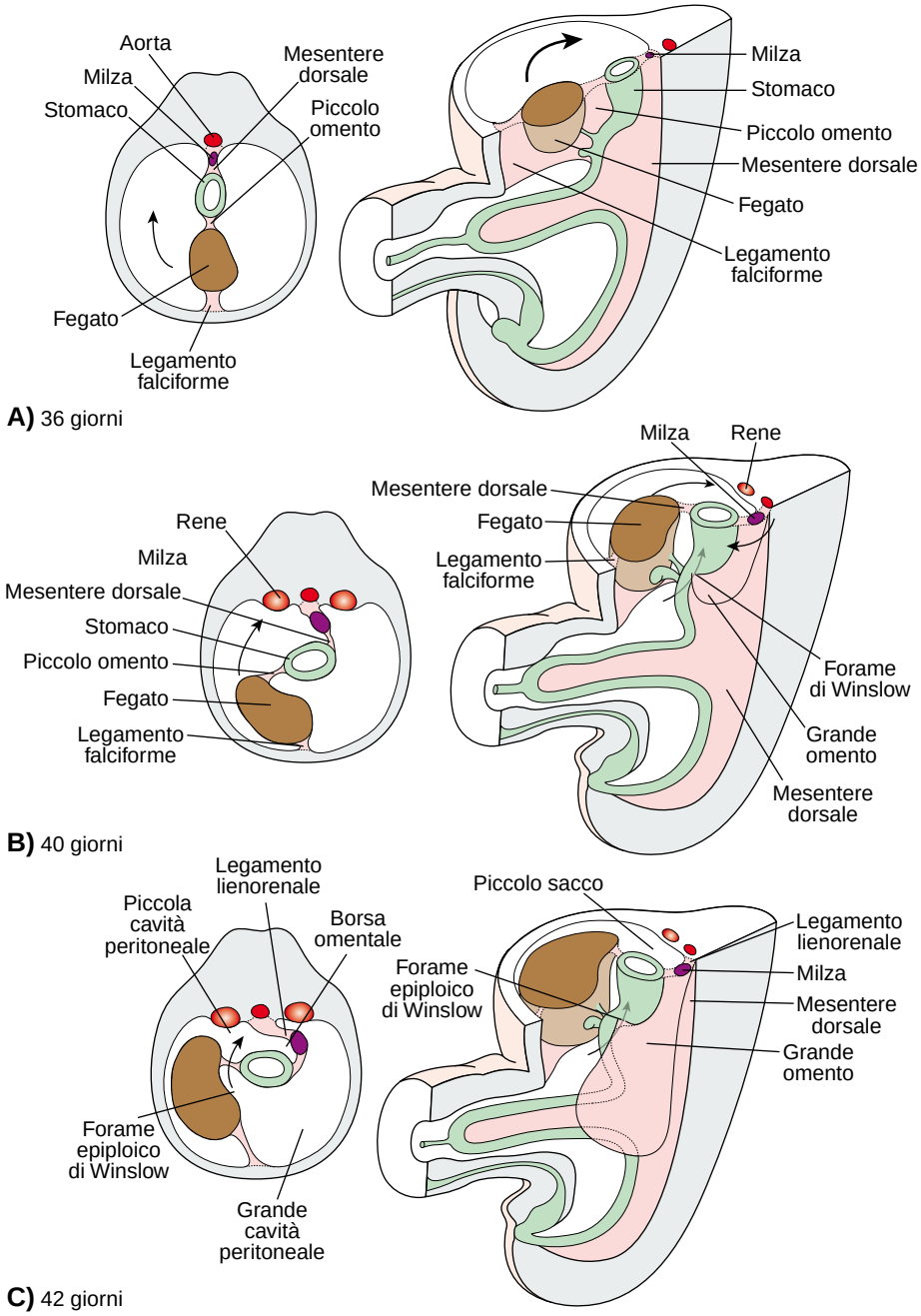



**Figura 15-7** ■ Immagine che illustra lo sviluppo dell'intestino e degli annessi mesenteri, rispettivamente a 36 giorni *(A)*, 40 giorni *(B)* e 42 giorni *(C)*.

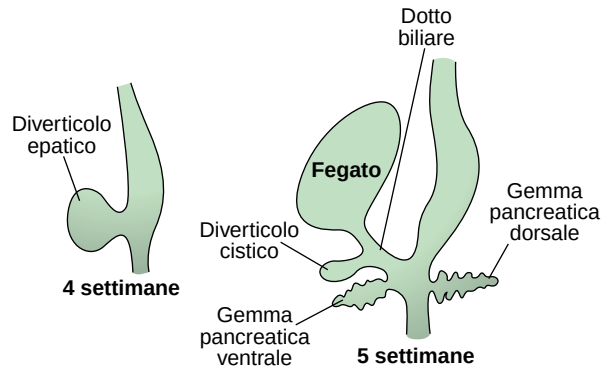



**Figura 15-8** ■ Abbozzo epatico ed abbozzi pancreatici.

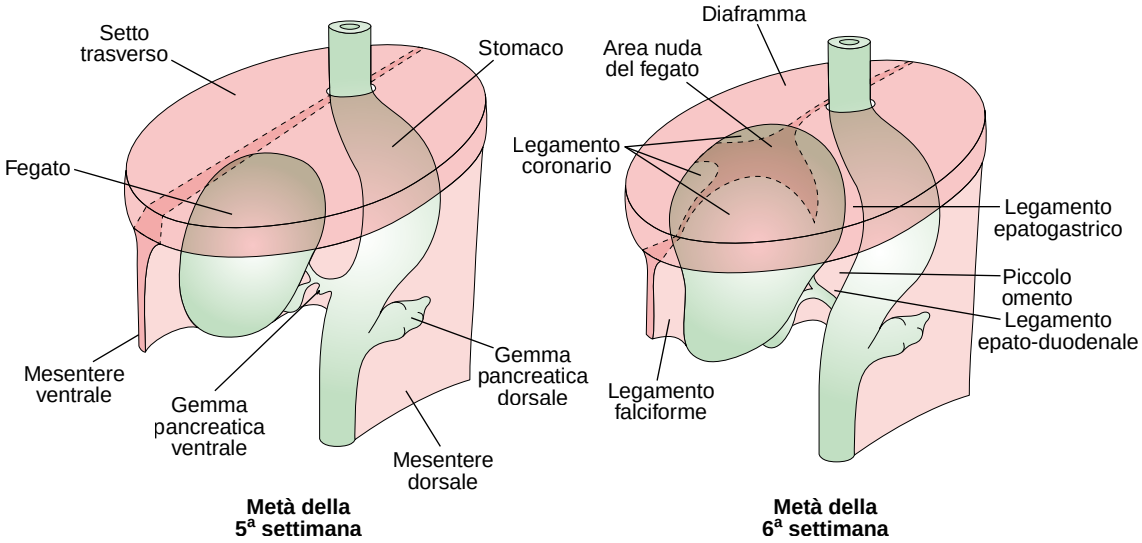



**Figura 15-9** ■ Formazione del fegato e delle sue tuniche e legamenti.

mando il pancreas definitivo. Il pancreas dorsale formerà tutto il pancreas (testa, corpo e coda) mentre quello ventrale solo il processo uncinato della testa. L'origine delle cellule delle isole del Langerhans, in cui sono contenute le cellule beta ad insulina, è incerta: deriverebbero, secondo alcuni, dalle cellule delle creste neurali, secondo altri proprio dall'endoderma intestinale, pur se la loro positività alla nestina, antigene di staminalità per le cellule neurali, conforterebbe la prima ipotesi.

Va qui ricordato che la milza non ha origine endodermica in quanto deriva dal mesoderma laterale splancnico.

## Intestino medio

Esso è costituito dalla porzione di intestino che è vascolarizzata dall'arteria mesenterica superiore (Fig. 15-11). Esso, come sopra riportato, si porta dal duodeno inferiore sino ai primi due terzi del colon trasverso.

Durante la 5ª settimana, l'intestino medio si allunga formando un'ansa intestinale primaria che si ripiega ad U intorno all'arteria mesenterica superiore. Durante la 6ª settimana l'allungamento dell'intestino medio insieme alla pressione dovuta alla crescita imponente del fegato, spingono l'ansa primaria ad uscire dalla cavità dell'addome ed a crescere entro il cordone ombelicale: in tal modo si forma l'**ernia fisiologica dell'intestino**.

L'abbozzo dell'intestino cieco si forma proprio sull'apice dell'ansa primaria: in tal modo inizia a formarsi l'intestino crasso; pertanto il braccio superiore dell'ansa formerà l'intestino tenue, mentre il braccio inferiore diverrà in-

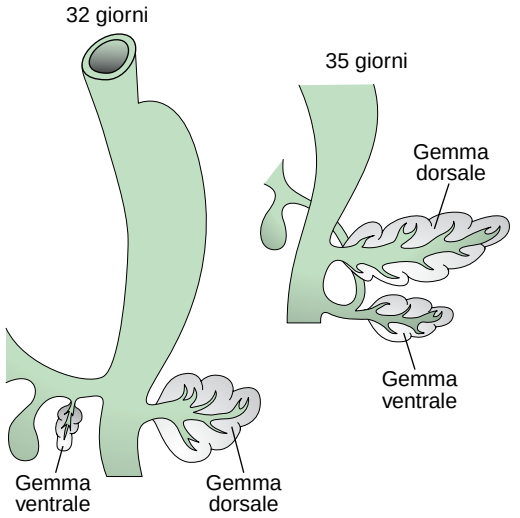



**Figura 15-10** ■ Evoluzione degli abbozzi pancreatici.

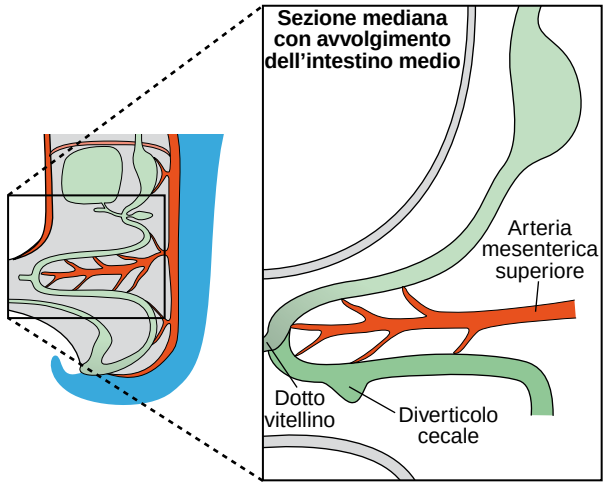



**Figura 15-11** ■ Intestino medio.

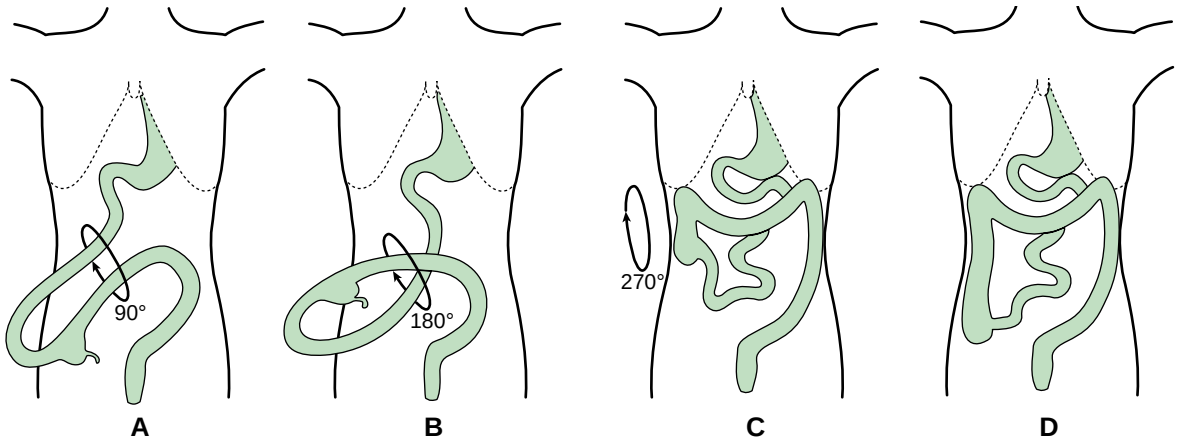



**Figura 15-12** ■ Rotazioni dell'intestino medio.

testino crasso. Inoltre l'ansa intestinale primaria ruota di 90° in senso antiorario intorno all'asse dell'arteria mesenterica superiore, per cui il futuro tenue si piega verso destra, mentre il futuro colon verso sinistra. All'8ª settimana la rotazione è completata ed il tenue si ripiega nelle anse secondarie, tipiche del digiuno e dell'ileo. Durante la 10ª settimana l'intestino medio rientra nell'addome per la nuova disponibilità di spazio e l'ansa primaria ruota di altri 180° per cui la rotazione complessiva è di 270° (Fig. 15-12). Come risultato si ha il posizionamento definitivo per cui: il colon ascendente, con il cieco, si pone a destra, quello discendente a sinistra ed il trasverso nel mezzo.

Una volta che l'intestino medio è rientrato nell'addome, i mesenteri del cieco, del colon ascendente e di quello trasverso vengono riassorbiti nelle pareti corporee per cui queste parti divengono fisse e secondariamente retroperitoneali. Invece il tenue, il colon trasverso e quello sigmoideo permangono intraperitoneali mantenendo i loro mesenteri; essi restano così mobili.

## Intestino posteriore

Si porta dal terzo esterno del colon trasverso alla membrana anale ed è quella porzione di intestino vascolarizzato dall'arteria mesenterica inferiore (Fig. 15-13).

L'ultimo terzo del canale anale deriva invece dall'ectoderma del proctodeo (ed è vascolarizzato dall'arteria iliaca interna). La separazione, nell'adulto, fra le due porzioni del canale anale, è data dalla **linea pettinata**, porzione ove sono presenti le **valvole anali**.

La porzione terminale dell'intestino o **cloaca** si suddivide, fra la 4ª e la 6ª settimana, grazie alla proliferazione del **setto** (o **sperone**) **uro-rettale** di origine mesodermica (splancnopleura), in una porzione anteriore o **seno uro-genitale** (vedi Capitolo 16) ed una posteriore o **retto**

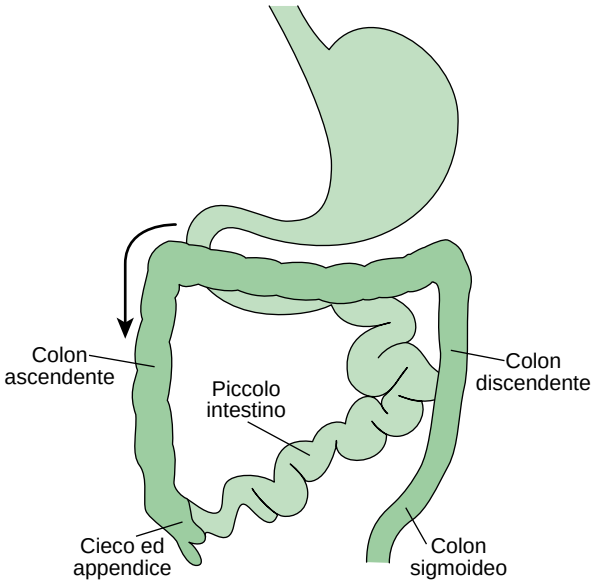



**Figura 15-13** ■ Intestino posteriore.

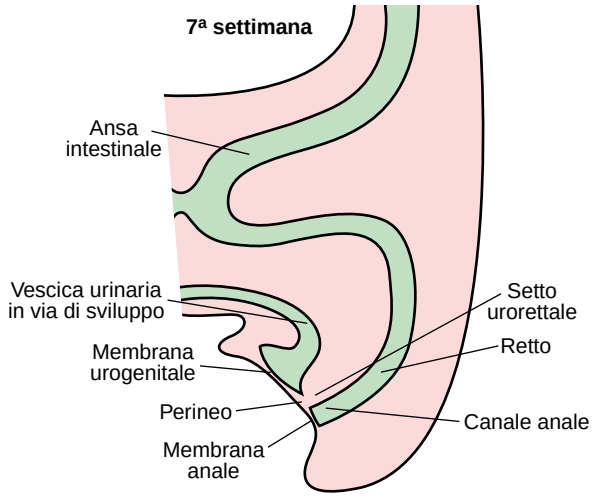



**Figura 15-14** ■ Suddivisione della cloaca in seno urogenitale e canale anorettale.

o **canale anorettale** (Fig. 15-14). Alla fine della 6ª settimana, il setto uro-rettale con la sua punta si fonde con la membrana cloacale dividendola in una parte anteriore o **membrana uro-genitale** ed in una posteriore o **membrana anale**. La zona in cui si fondono il setto e la membrana forma il **perineo**. Dal setto urorettale deriva il corpo perineale, o corpo tendineo, del perineo.

### Canalizzazione

L'endoderma del tubo intestinale, durante la 6ª settimana prolifera abnormemente andando ad obliterare il lume del tubo. Nelle due settimane successive pian piano si ha la formazione di ampie aree di vacuolizzazione fino alla completa ricanalizzazione del tubo. Alla 9ª settimana l'epitelio differenzia.

Alterazioni della ricanalizzazione portano a stenosi, atresie o duplicazioni del tubo digerente.

## PROCESSI E MOLECOLE

### *Geni e fattori di crescita implicati nello sviluppo dell'apparato digerente*

#### *Differenziamento dell'endoderma definitivo*

Come descritto nelle precedenti sezioni, i tessuti epiteliali che si organizzano a formare le diverse strutture dell'apparato digerente derivano dall'endoderma definitivo, che si forma in gran parte durante la gastrulazione. Ma quali fattori presiedono alla formazione dell'endoderma? Studi condotti in varie specie di invertebrati e nel topo hanno identificato diversi geni che codificano per fattori di crescita e fattori di trascrizione che partecipano a questo processo. In breve, cellule dell'epiblasto che si trovano nella regione della linea primitiva più vicina al nodo di Hensen, mentre migrano durante la gastrulazione al disotto di questa regione, ricevono segnali (in particolare da **WNT3a**) da parte delle cellule limitrofe dell'epiblasto e del trofoblasto, che inducono la produzione di **Nodal** e **GDF1/3**, due fattori di crescita che, a loro volta, attivano in modo autocrino (nelle cellule endodermiche) vie di segnalazione che portano all'espressione di geni come ***Gata*** (globin transcription factor), ***Sox17*** (Srybox17) e ***Mix*** che codificano per fattori di trascrizione fondamentali per l'espressione di altri geni quali ***Hnf1β*** (hepatocyte nuclear factor 1), ***Foxa1/2*** (fork head box A), i quali da ultimo guidano il differenziamento delle cellule endodermiche (Fig. 15-15).

Si tratta, ripetesi, di studi condotti in altre specie, che non hanno sinora trovato conferma nell'Uomo.

#### *Determinazione delle regioni dell'intestino primitivo*

Le cellule endodermiche che migrano per prime sono quelle che si posizionano nella regione anteriore dell'intestino primitivo. Inizialmente vengono determinate le regioni anteriore e posteriore a seguito dell'espressione nella prima di diversi geni omeotici tipici della regione craniale dell'embrione come ***Cerberus1*** e ***Otx2*** e nella seconda di ***Cdx1/2*** (caudal type homeobox transcription factor 2). Durante lo sviluppo dei somiti, le diverse regioni dell'intestino primitivo vengono progressivamente specificate sia lungo l'asse antero-posteriore che dorso-ventrale e laterale (destra-sinistra). I segnali responsabili di questa regionalizzazione sono gli stessi di quelli che guidano la regionalizzazione del tubo neurale, ovvero principalmente gradienti di **WNT3a**, **FGF4** e dell'**acido retinoico**. Come illustrato in Figura 15-16, tali gradienti determinano l'espressione regionalizzata di diversi fattori di trascrizione e specifici geni. Va ricordata qui anche l'importanza di **SHH**, una proteina fondamentale nel mediare le interazioni epitelio-mesenchima nei primi stadi dello sviluppo dell'intestino posteriore.

Infine, la formazione di organi in determinate regioni, come la tiroide, il fegato o il pancreas, è controllata da specifici segnali locali prodotti da strutture vicine. Uno di questi è FGF2, prodotto dall'abbozzo del cuore, che induce la formazione dell'albero bronchiale e del fegato. Il setto trasverso produce BMP4, che pure è necessario per lo sviluppo del fegato, mentre il pancreas si sviluppa solamente in un'area ove questo fattore di crescita è inibito e non è presente SHH. Infine FGF10 è necessario per la formazione di diversi organi lungo l'intestino come il pancreas, i polmoni, le ghiandole intestinali e l'intestino cieco.

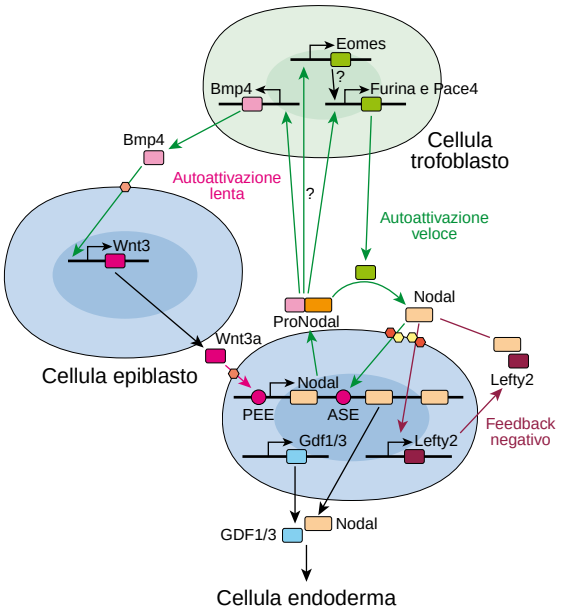



**Figura 15-15** ■ Geni e fattori di crescita implicati nel differenziamento dell'endoderma definitivo. Segnali del trofoblasto (BMP4 e Furina/Pace4) ed epiblasto (WNT3a) attivano circuiti autocrini nelle cellule dell'epiblasto in migrazione durante la gastrulazione, che le inducono a differenziare in endoderma (*Gata*, *Sox17*, *Mix*).

## ASPETTI CLINICI

### *Principali malformazioni*

L'**atresia** consiste nella mancata formazione di una o più porzioni dell'intestino. La **stenosi** del piloro è do-

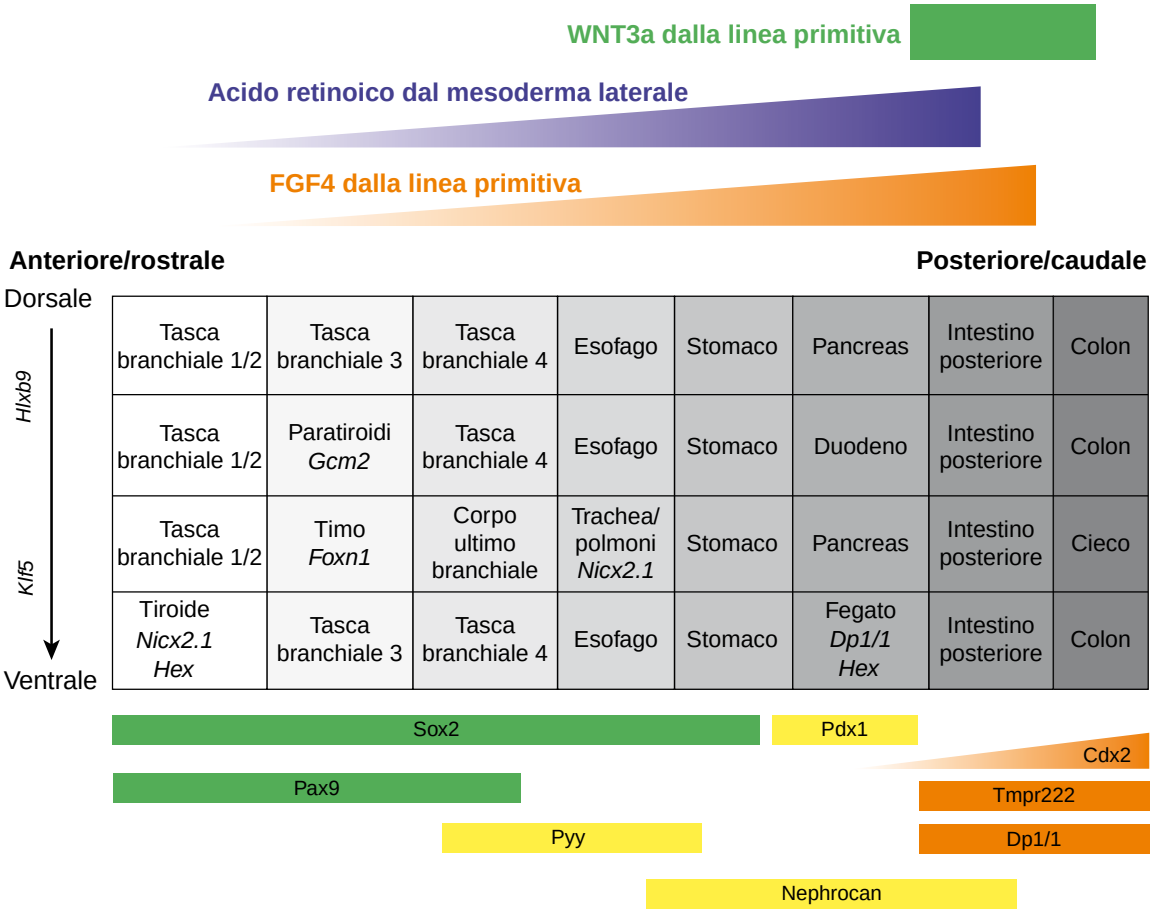



**Figura 15-16** ■ Gradienti di fattori di crescita (in alto) e geni (in basso) implicati nella determinazione delle regioni dell'intestino primitivo.

vuta ad ipertrofia del muscolo che lo va a costituire. Esso determina vomito a getti. Il **pancreas anulare** consiste nella fusione ad anello dei due abbozzi primitivi. Può causare ostruzione del duodeno. Residui del dotto vitellino portano alla **diverticolite del Meckel**. L'**onfalocele** consiste nel rientro incompleto delle anse intestinali. Frequenti le **ernie ombelicali congenite**, la **gastroschisi**, i **difetti di rotazione**, le **inversioni** e i **difetti "misti"**, fino all'**onfalocele** (Fig. 15-17). Il **volvolo** è causato da un ritorno anomalo dell'ansa intestinale nell'addome con attorcigliamento che ostruisce l'arteria mesenterica superiore.

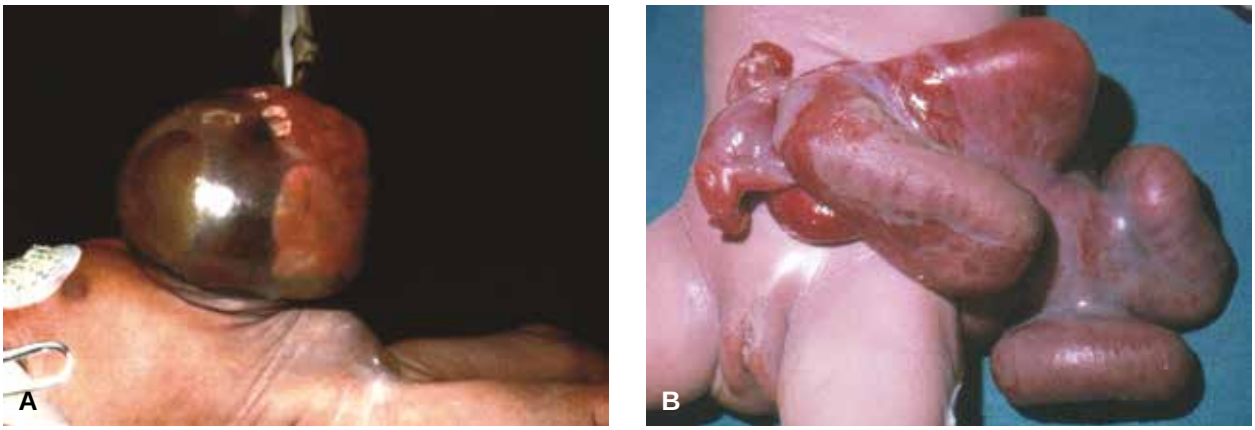



**Figura 15-17** ■ Onfalocele con gastroschisi. (*Da* M.A. Castello, Manuale di pediatria, Piccin Nuova Libraria, 2007).

Il **megacolon** è una dilatazione cospicua del colon e dell'intero addome, causato dalla mancanza dei gangli del sistema nervoso autonomo (**morbo di Hirschsprung**).

L'**ano imperforato**, l'**agenesia anale** e la **stenosi anale**, fino all'**atresìa rettale** sono tutte malformazioni della porzione ano-rettale, spesso accompagnate da fistole.

## FORMAZIONE DELL'APPARATO RESPIRATORIO

### Cenni di anatomia ed istologia

L'apparato respiratorio è costituito da parti comuni a quello digerenti e da parti proprie (Fig. 15-18). Inizia con il **naso esterno** e le **cavità nasali**, dalle quali l'aria viene trasportata alla rinofaringe. Altra aria può passare dalla bocca all'orofaringe. A questo punto i canali dei due apparati cambiano posizione. Difatti l'apparato respiratorio si pone in avanti con la **laringe** il cui **aditus** viene chiuso dall'epiglottide ogni volta in cui passa il bolo alimentare. Dalla laringe, che è un organo costituito da numerose cartilagini e ha la funzione fonatoria, si passa alla **trachea**, un tubo con cartilagini incomplete posteriormente, che si continua con i **bronchi principali**. Da questi si dipartono le diramazioni per i **polmoni** di destra, costituito da tre lobi e di sinistra, costituito da due lobi. Quello di sinistra ha minori dimensioni per la posizione del cuore. Le diramazioni dei bronchi ne riducono man mano lo spessore per terminare negli alveoli, sede dello scambio ematosico. La parete della trachea e dei bronchi è costituita da mucosa, sottomucosa con cartilagine, tessuto muscolare liscio e mesotelio pleurico. L'epitelio, la cartilagine e la muscolatura liscia subiscono modificazioni mano a mano che le ramificazioni dei bronchi diventano più piccole per cui si assiste sia ad un assottigliamento fino alla perdita della cartilagine così come della muscolatura liscia, sia ad una modifica dell'epitelio che da batiprismatico pluriseriato con ciglia vibratili e cellule caliciformi mucipare (trachea) diviene isoprismatico, perde le ciglia e quindi pavimentoso semplice a livello della parete degli alveoli.

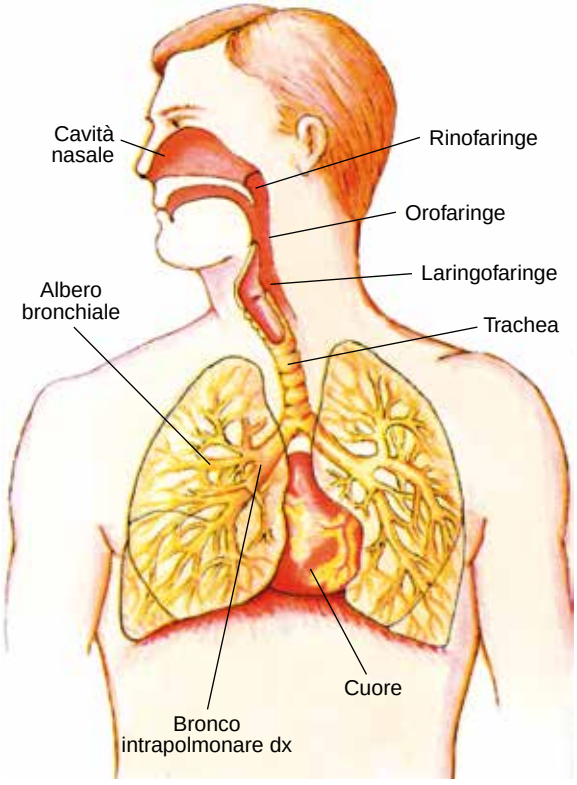



**Figura 15-18** ■ Schema dell'apparato respiratorio. (*Da* G. Goglia, Anatomia umana, Piccin Nuova Libraria, 1999).

### Sviluppo embrionale

L'apparato respiratorio è costituito dalle prime vie aeree comprendenti le cavità nasali ed il **rinofaringe**, che si sviluppano dall'apparato faringeo e dalle pareti dello stomodeo e dall'**albero respiratorio** che origina da un diverticolo dell'intestino anteriore o faringeo detto **doccia tracheale**. Esso formerà laringe, trachea, bronchi e polmoni.

La doccia tracheale (Fig. 15-19) dalla parete anteriore del tubo intestinale si allunga in basso sulla linea mediana; indi i suoi bordi si invaginano formando delle pieghe le quali poi confluiscono al centro per formarvi il setto esofago-tracheale, che suddivide il tubo intestinale in due porzioni: il **tubo tracheale** in avanti ed il **tubo intestinale** posteriormente. Il setto si prolunga sia in basso che verso l'alto andando a separare completamente trachea ed esofago, che rimarranno uniti solo in alto a livello della futura laringe.

Alla fine della 4ª settimana nella porzione inferiore del tubo tracheale compare un rigonfiamento di tipo sferico, la **gemma bronchiale primitiva**, la quale si suddivide subito in due rami, destro e sinistro, gli **abbozzi dei bronchi primari** (Fig. 15-20).

Pertanto alla fine della 4ª settimana potremo osservare, dall'alto verso il basso: l'abbozzo della laringe, quello

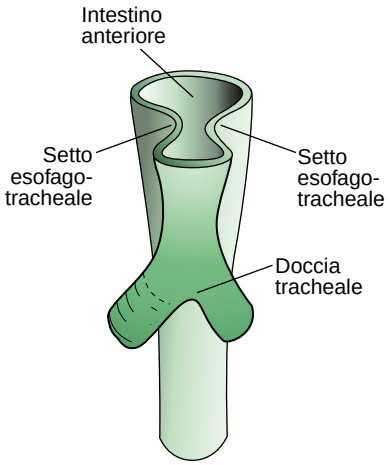



**Figura 15-19** ■ Doccia tracheale.

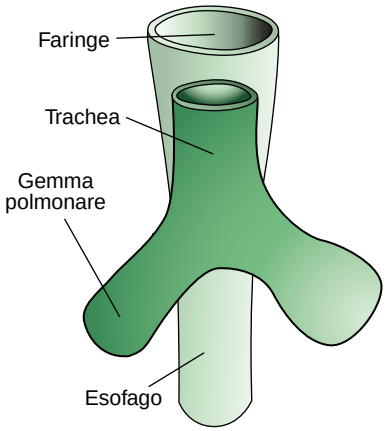



**Figura 15-20** ■ Abbozzi bronchiali.

della trachea e l'abbozzo bronchiale. Tutti i rivestimenti sono endodermici, il connettivo, vasi e muscoli sono mesodermici (mesoderma laterale splancnico).

## Laringe

L'aditus ad laringem è una fenditura sita sul pavimento dell'intestino faringeo, fra il IV ed il VI arco faringeo. Il mesenchima ai lati di tale fenditura, alla 4ª settimana, prolifera formando i rigonfiamenti aritenoidei, i quali ultimi trasformano tale fenditura rettilinea in un'apertura a forma di T, detta glottide primitiva. Durante il secondo mese di sviluppo vi è una proliferazione dell'epitelio laringeo che ne oblitera il lume; successivamente esso degenera e si ha la ricanalizzazione intorno alla 10ª settimana, con la formazione delle corde vocali.

L'**epiglottide** (valvola sita all'apertura o aditus della laringe) si sviluppa dalla porzione inferiore dell'eminenza ipobranchiale (vedi apparato faringeo), e risulterà alla fine costituita da tessuto cartilagineo elastico.

Le cartilagini laringee, cricoidea, tiroidea, aritenoidee ed epiglottica deriveranno, insieme ai muscoli, da cellule mesenchimali del IV e VI arco faringeo. L'innervazione è a carico del nervo vago.

## Trachea

Dapprima è costituita da un corto tubo che fra la 5ª e la 6ª settimana si allunga considerevolmente ed è circondato da mesenchima addensato che andrà a formare gli anelli tracheali. L'epitelio e le ghiandole tracheali sono di origine endodermica, mentre cartilagini e muscoli derivano dal mesoderma splancnico.

## Bronchi

La parte inferiore del tubo tracheale, come già detto, forma due gemme, i bronchi primari alla fine della 4ª settimana. Durante la 5ª settimana, la gemma di destra che è di maggiori dimensioni, forma 3 bronchi secondari o lobari, laddove quella di sinistra ne forma due. Ciascuno di essi andrà a formare un lobo polmonare, 2 a sinistra e 3 a destra.

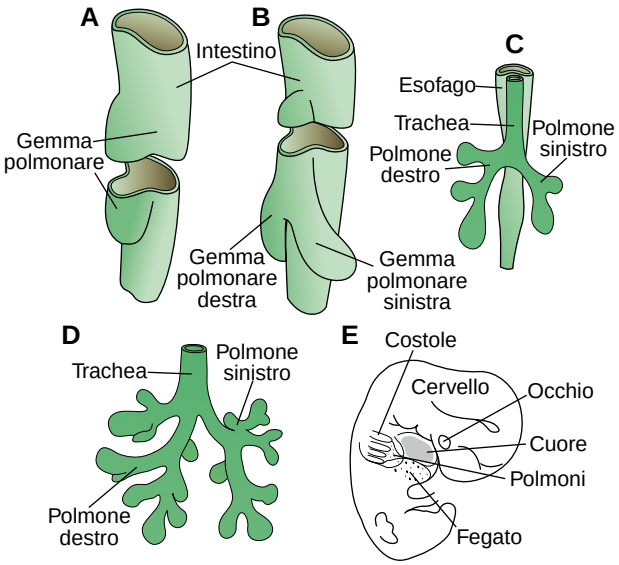



**Figura 15-21** ■ Dalla doccia tracheale ai bronchi secondari ed agli abbozzi polmonari.

Successivamente, alla 6ª settimana, i bronchi secondari si ramificano nei **bronchi terziari** o **segmentari** (in numero di 10 a destra ed 8 a sinistra). Alla **fase bronchiale** seguono altri 4 periodi (**fase polmonare**) che porteranno alla formazione dei **bronchioli** e quindi degli **alveoli** (Fig. 15-21).

## Polmoni

I polmoni hanno uno sviluppo di tipo continuo, pur se classicamente lo si suddivide nelle fasi bronchiali e polmonari, come sopra descritte.

Durante le singole fasi possiamo ancora distinguere dei periodi (Fig. 15-22):

- **periodo pseudo-ghiandolare**, che va dal secondo al quarto mese, durante il quale i bronchi terziari si ramificano in 16 ordini che poi portano alla formazione di ramificazioni di dimensioni sempre inferiori fino a formare i **bronchioli terminali**;
- **periodo canalicolare**, dal quarto al settimo mese durante il quale ogni bronchiolo terminale si suddivide in due o più **bronchioli respiratori** ed il mesoderma che li circonda va a formare numerosi vasi sanguigni. I bronchioli respiratori sono ricoperti da pneumociti di I tipo e di II tipo, i quali producono il **surfactante**, sostanza tensioattiva (proteine surfattanti A, B e C) necessaria a mantenere beanti gli alveoli nell'espirazione;
- **periodo sacculare** dal settimo al nono mese, durante il quale ogni bronchiolo respiratorio si divide in 3 alveoli primitivi circondati da una fitta rete vascolare. In tale periodo è possibile la sopravvivenza dei feti;
- **periodo alveolare**, dalla fine della gestazione sino ad 8 anni di età, è caratterizzato dalla maturazione dei polmoni con formazione di alveoli definitivi (nella loro forma definitiva si formano per il 95% solo dopo la nascita).

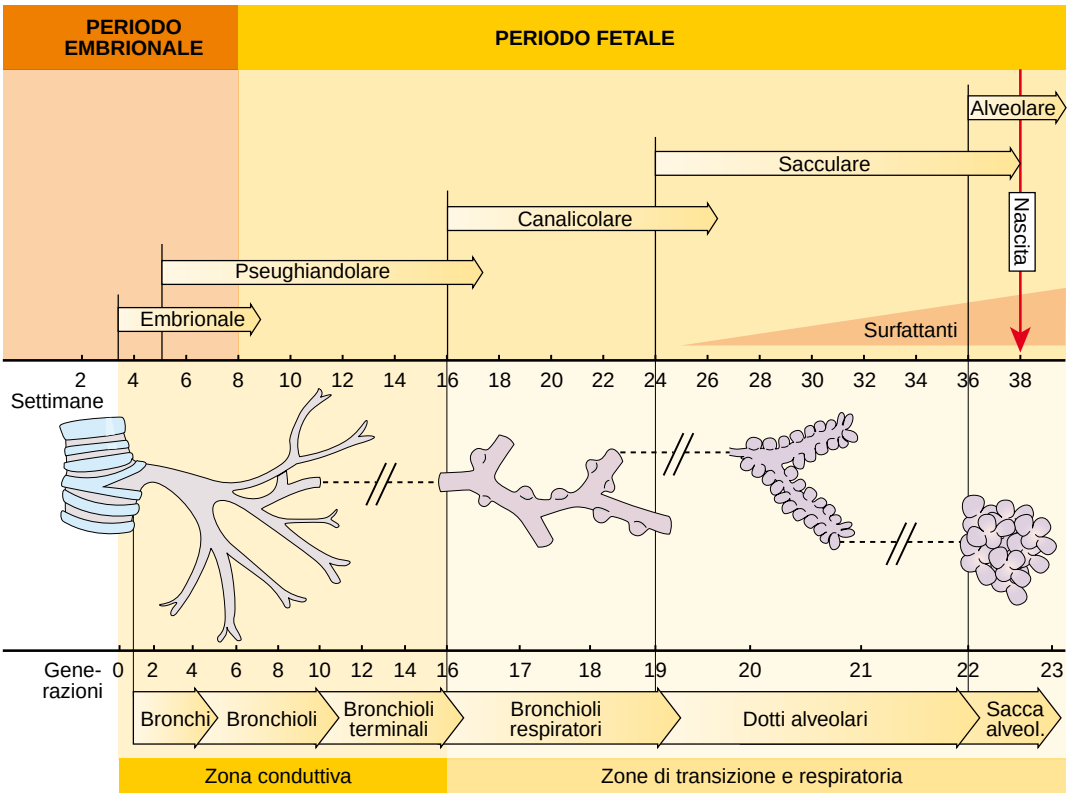



**FIGURA 15-22** ■ Periodi o fasi di sviluppo del polmone.

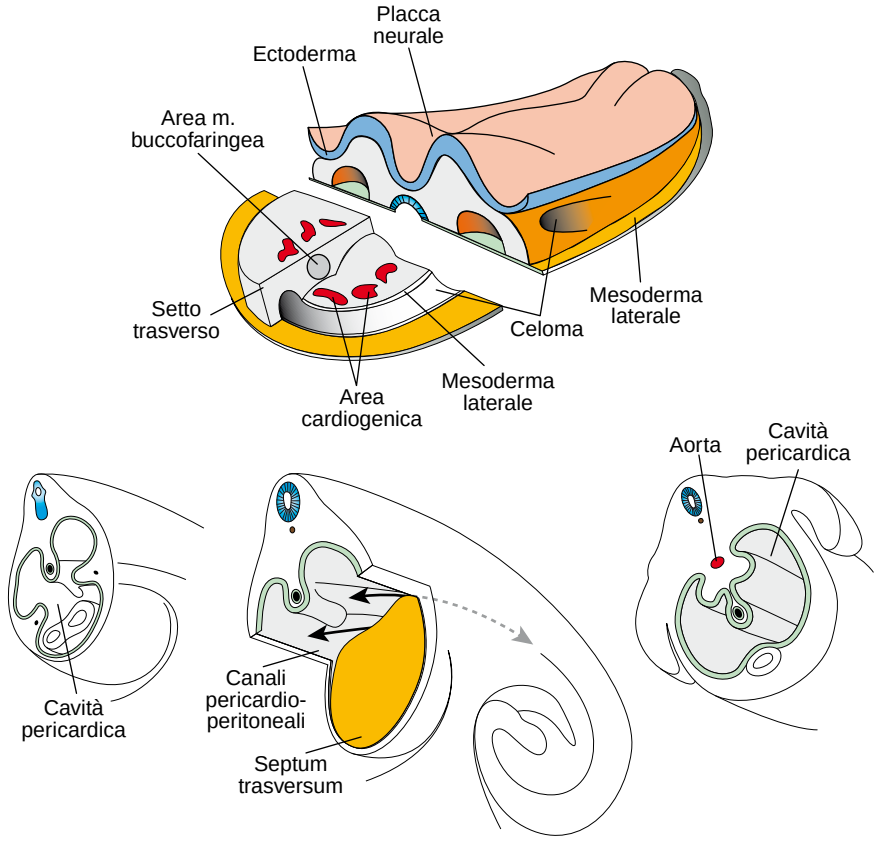



**FIGURA 15-23** ■ Evoluzione della cavità celomatica tra l'inizio della 4ª settimana e la 6ª settimana.

Movimenti respiratori fetali si instaurano prima della nascita con forza sufficiente a causare aspirazione di liquido amniotico nei polmoni. Tali movimenti respiratori sono intermittenti ed essenziali per lo sviluppo normale dei polmoni.

Alla nascita i polmoni sono per metà pieni di liquido amniotico per cui alla nascita si ha un rapido scambio del liquido con l'aria.

Il liquido presente nei polmoni viene evacuato attraverso:

- bocca e naso per la pressione esercitata sul torace durante il parto per via vaginale;
- da capillari, arterie e vene polmonari;
- dai vasi linfatici.

I rivestimenti mucosi dei polmoni sono di origine endodermica laddove la componente connettivo-muscolare e cartilaginea (ove presente) deriva dal mesoderma splancnico.

### Cavità celomatica e suo sviluppo

Il celoma embrionale è una cavità a forma di ferro di cavallo con la porzione arrotondata rivolta cranialmente, che si forma durante la 3ª settimana di sviluppo fra le due porzioni del mesoderma laterale, la splancnopleura e la somatopleura (Fig. 15-23). All'inizio esso è in comunicazione con il celoma extraembrionale ma, durante la 4ª settimana, i ripiegamenti dell'embrione separeranno le due cavità. Quindi il celoma intraembrionale viene parzialmente separato in due parti dal septum trasversum. La porzione superiore o toracica contiene il cuore (**cavità pericardica primitiva**) mentre quella inferiore o addominale è detta **cavità peritoneale**. Tali due cavità comunicano mediante due canali dorsolaterali detti **canali pericardio-peritoneali**. Successivamente, con la crescita dei polmoni si formerà la cavità pleurica, la quale inizialmente è la continuazione dei canali pericardioperitoneali e, successivamente, fra la 5ª e la 7ª settimana, diverrà cavità autonoma come le altre due. Ciò in quanto dalle pareti laterali del corpo dell'embrione si accrescono delle pieghe mesodermiche che si interporranno fra cuore e polmoni (**pieghe pleuro-pericardiche**) così da formare una cavità separata per il cuore. La cavità pleurica si separerà poi da quella peritoneale solo allorquando, alla 7ª settimana, si frapporrà il **diaframma**.

### Diaframma

Il diaframma rappresenta una barriera composta da muscoli e tendini. Esso si forma a seguito della fusione di 4 strutture embrionali: 1) il septum trasversum; 2) le membrane pleuroperitoneali; 3) il mesentere dorsale dell'esofago; 4) la componente muscolare proveniente dal mesoderma delle pareti laterali del corpo.

Il setto traverso formerà la maggior parte della porzione tendinea del diaframma. Esso si accresce dorsalmente formando una lamina semicircolare che separerà il cuore dal fegato, il quale, per un certo tempo del suo sviluppo, vi rimane incluso. Le altre tre strutture formeranno i muscoli che lo compongono. L'innervazione è data dal nervo frenico. Il diaframma è fissato alla parete dorsale del corpo della prima vertebra lombare.

### Formazione delle pareti laterali del corpo

Fra la 9ª e la 12ª settimana, i polmoni e le cavità pleuriche si accrescono a spese delle pareti laterali del corpo. Durante questo processo il tessuto che costituisce la parete del corpo si suddivide in due strati:

- esterno, che farà parte della parete addominale definitiva, costituito da tessuto connettivo sottocutaneo (**ipoderma**) e da uno strato chiamato **fascia profonda**;
- interno, che apporta muscolatura alla parte periferica del diaframma.

L'ulteriore estensione delle cavità pleuriche all'interno della parete laterale del corpo formerà i **recessi costo-diaframmatici** i quali conferiscono al diaframma la caratteristica forma a cupola.

## PROCESSI E MOLECOLE

### *Geni e fattori di crescita implicati nello sviluppo dell'apparato respiratorio*

In generale i processi molecolari che controllano lo sviluppo dell'apparato respiratorio sono poco noti o comunque in parte comuni a quelli coinvolti nello sviluppo dell'intestino primitivo anteriore. Solo allorquando si ha lo sviluppo delle ramificazioni dell'albero bronchiale inizia la cosiddetta regolazione determinata da interazioni epitelio-mesenchimali tra l'endoderma degli abbozzi polmonari ed il mesoderma splancnico che li avvolge. I segnali molecolari provenienti dal mesoderma/mesenchima coinvolgono proteine della famiglia dell'FGF in particolare FGF9/10. Geni come ***Hex1*** (hematopoietically expressed homeobox 1) e ***Foxa2*** (forkhead box a2), espressi nell'intestino anteriore, contribuiscono anche allo sviluppo del polmoni. Altri geni, coinvolti nella formazione della membrana alveolare, appartengono alla famiglia dei geni ***Tbx*** (T box homeotic gene). Un ruolo importante nell'arborizzazione dell'albero bronchiale è svolto dall'**EGF** (epidermal growth factor) prodotto dal mesenchima e che stimola le cellule epiteliali a sintetizzare e secernere enzimi della famiglia delle metalloproteasi (MMP) in grado di degradare componenti della matrice dei tessuti connettivi. La stabilizzazione delle ramificazioni bronchiali richiede inoltre la partecipazione di numerose molecole della matrice extracellulare come la fibronectina e i proteoglicani. Il fattore di trascrizione ***FOXE2*** (forkhead box E2) inoltre regola, attraverso l'espressione dell'integrina beta3, il processo di vascolarizzazione dei polmoni. La morfogenesi dei polmoni è mediata quindi da complesse interazioni paracrine fra l'epitelio respiratorio e il mesenchima. Tali interazioni dirigono i programmi di espressione genica guidando il differenziamento. Proteine codificate dai geni della famiglia ***Klf5*** (kruppel-like factor) controllano le interazioni paracrine durante la morfogenesi dei polmoni, così come la regolazione della maturazione dell'epitelio respiratorio necessaria per la sua funzione

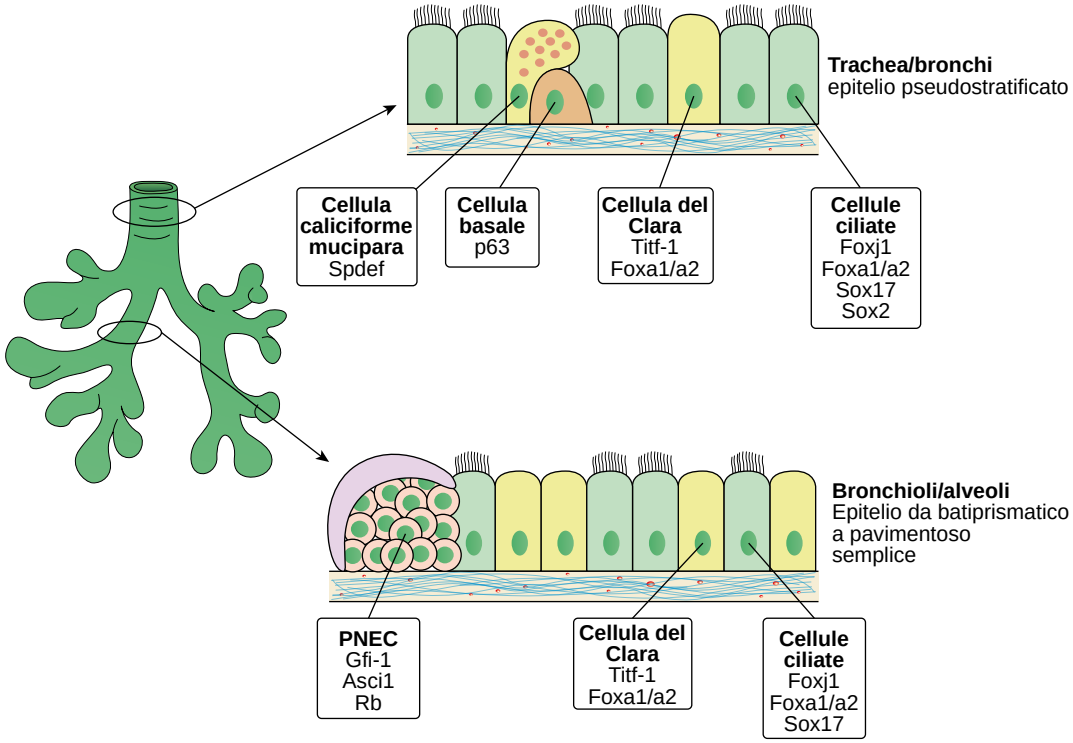



**Figura 15-24** ■ Geni che presiedono al differenziamento delle cellule epiteliali dell'apparato respiratorio. PNEC = pulmonary neuroendocrine cells.

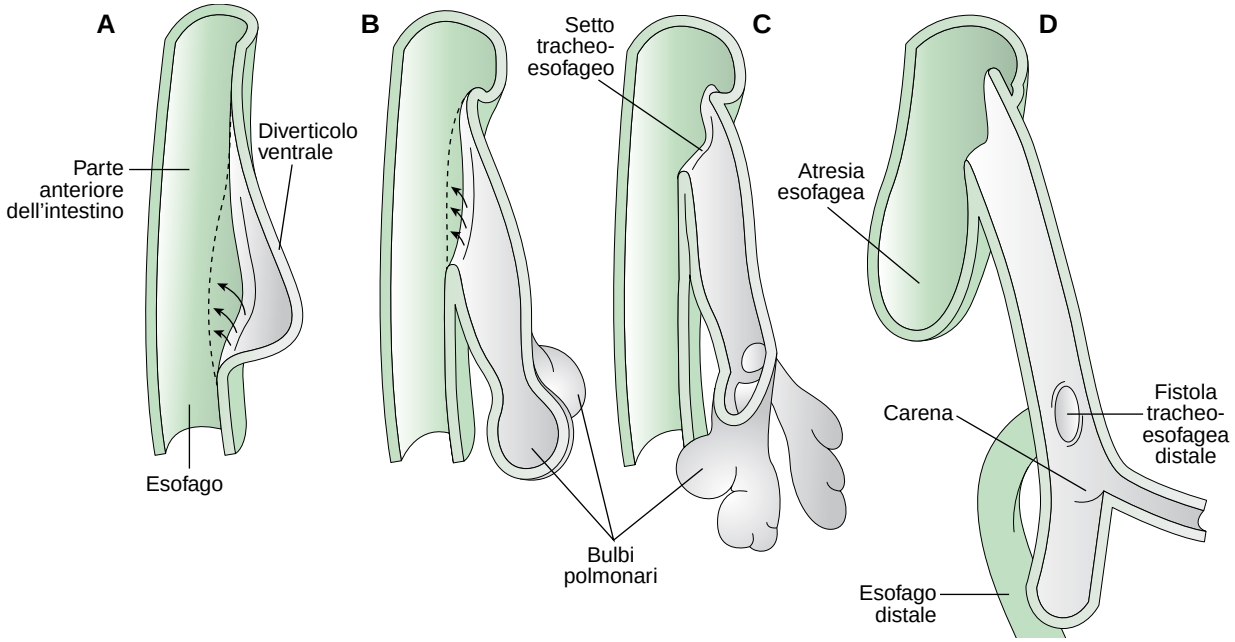



**Figura 15-25** ■ Alterazioni che portano all'atresìa esofagea.

dopo la nascita. In particolare una proteina chiamata **Epimorfina** sembra essere particolarmente importante per l'organizzazione dell'epitelio alveolare in strutture tubulari. In sua assenza difatti nei topi l'epitelio alveolare rimane disorganizzato. Nella Figura 15-24 è riportata l'espressione di geni che presiedono al differenziamento delle diverse popolazioni di cellule dell'epitelio che riveste alcuni tratti delle vie respiratorie.

**Figura 15-26** ■ Comunicazione addomino-pleurica per agenesia diaframmatica.

Va anche detto che i movimenti respiratori fetali hanno effetto sulla cinetica delle cellule polmonari regolando l'espressione dei fattori di crescita quali il PDGF (dalle piastrine) ed i fattori di crescita simili all'insulina (IGF), oltre a determinare il gradiente di espressione del fattore di trascrizione tiroideo (TRF-1).

## ASPETTI CLINICI

### *Principali malformazioni*

La **fistola esofagotracheale** è una delle malformazioni più comuni; essa è dovuta ad una incompleta separazione della doccia tracheale dall'intestino primitivo. Spesso è associata ad **atresìa** dell'esofago (Fig. 15-25). Durante la vita fetale l'atresìa dell'esofago impedisce al feto di deglutire il liquido amniotico per cui l'accumulo eccessivo di tale liquido porta al cosiddetto **polidramnios** che determina compressione con svariati difetti alla nascita. L'**oligoidramnios** invece, determinando una carenza di liquido amniotico, che scende al di sotto di 500 ml, può determinare una compressione della parete uterina con conseguente compressione della cavità pleurica e difetti di crescita dei polmoni.

La **malattia della membrana ialina** o **insufficienza respiratoria** è dovuta al fatto che gli alveoli sono ripieni di un fluido proteico che forma una membrana sulla superficie respiratoria, a causa della mancanza o scarsità di surfactante le cui proteine sono deputate alla rimozione di tali fluidi.

Il mancato sviluppo o assenza dei polmoni determinerà **agenesie** o **ipoplasie** di vario grado ed estensione.

Alterazioni dello sviluppo del diaframma determinano **ernie** o **sventramenti** (Fig. 15-26).

## Letture consigliate

**Sviluppo dell'apparato digerente**

Davis NM, Kurpios NA, Sun X, Gros J, Martin JF, Tabin CJ. The chirality of gut rotation derives from left-right asymmetric changes in the architecture of the dorsal mesentery. Dev Cell 15, 134-145, 2008.

Kurpios NA, Ibañes M, Davis NM, Lui W, Katz T, Martin JF, Belmonte JC, Tabin CJ. The direction of gut looping is established by changes in the extracellular matrix and in cell:cell adhesion. Proc Natl Acad Sci USA 105, 8499-8506, 2008.

Stringer EJ, Pritchard CA, Beck F. Cdx2 initiates histodifferentiation of the midgut endoderm. FEBS Lett 582, 2555-2560, 2008.

**Sviluppo dell'apparato respiratorio**

Adamson IYR. Development of lung structure. In: RG Crystal, JB West, ER Weibel, PJ Barnes (eds), The lung: scientific foundations, 2nd ed, Lippincott-Raven Publishers, 1997.

Blanco CE. Maturation of fetal breathing activity. Biol Neonate 65(3-4), 182-188, 1994.

Goldin GV, Wessells NK. Mammalian lung development: the possible role of cell proliferation in the formation of supernumerary tracheal buds and in branching morphogenesis. J Exp Zool 208(3), 337-346, 1979.

Grifone R, Jarry T, Dandonneau M, Grenier J, Duprez D, Kelly RG. Properties of branchiomeric and somite-derived muscle development in Tbx1 mutant embryos. Dev Dyn 237, 3071-3078, 2008.

Koshida S, Hirai Y. Identification of cellular recognition sequence of epimorphin and critical role of cell/epimorphin interaction in lung branching morphogenesis. Biochem Biophys Res Commun 234(2), 522-525, 1997.

Mesbah K, Harrelson Z, Théveniau-Ruissy M, Papaioannou VE, Kelly RG. Tbx3 is required for outflow tract development. Circ Res 103, 743-750, 2008.

Rannels SR, Rannels DE. The type II pneumocyte as a model of lung cell interaction with the extracellular matrix. J Mol Cell Cardiol 21 (Suppl 1), 151-159, 1989.

Shan L e coll. Bombesin-like peptide (blp) receptor gene expression, regulation and function in fetal murine lung. Lung Cell Mol Physiol, pubblicato on line 5 sett. 2003.

Wan H, Luo F, Wert SE, Zhang L, Xu Y, Ikegami M, Maeda Y, Bell SM, Whitsett JA. Kruppel-like factor 5 is required for perinatal lung morphogenesis and function. Development 135, 2563-2572, 2008.

Zeltner TB, Burri PH. The postnatal development and growth of the human lung. II. Morphology. Respir Physiol 67(3), 269-282, 1987.

16

# Lo sviluppo dell'apparato urogenitale

Carla Boitani e Massimo De Felici

L'apparato urogenitale è formato dal **sistema urinario** e dal **sistema riproduttore**. Il primo, composto dai **reni** e dalle **vie urinarie**, è deputato alla purificazione del sangue e all'eliminazione dei prodotti di rifiuto disciolti nell'urina. Il secondo, diverso nei due sessi, è composto dalle **gonadi**, dalle **vie genitali** e dai **genitali esterni**. Esso provvede alla formazione delle cellule germinali, consente il loro incontro alla fecondazione e, nella donna, fornisce l'apparato (utero) per lo sviluppo di un nuovo individuo. Inoltre le gonadi svolgono la funzione di ghiandole endocrine producendo e secernendo ormoni che controllano sia la stessa riproduzione sia altre caratteristiche dell'individuo, in particolare i caratteri sessuali secondari. Sebbene lo sviluppo dei due sistemi nell'embrione avvenga contemporaneamente e con reciproche interazioni tra gli abbozzi degli organi che li costituiscono, per ragioni didattiche tratteremo separatamente lo sviluppo del sistema riproduttore e quello del sistema urinario.

## FORMAZIONE DEL SISTEMA RIPRODUTTORE

La **gametogenesi** è l'insieme dei processi che portano allo sviluppo degli **ovociti** nella donna e degli **spermatozoi** nell'uomo, ovvero delle **cellule germinali mature** o **gameti**. Le cellule germinali sono specializzate a trasmettere i geni dai genitori ai figli, a compiere il processo della fecondazione e a dare origine ad un nuovo individuo. La gametogenesi inizia verso la fine della 3ª settimana dello sviluppo embrionale con la formazione delle **cellule germinali primordiali** (primordial germ cells, PGC), continua durante il periodo fetale e quello po-

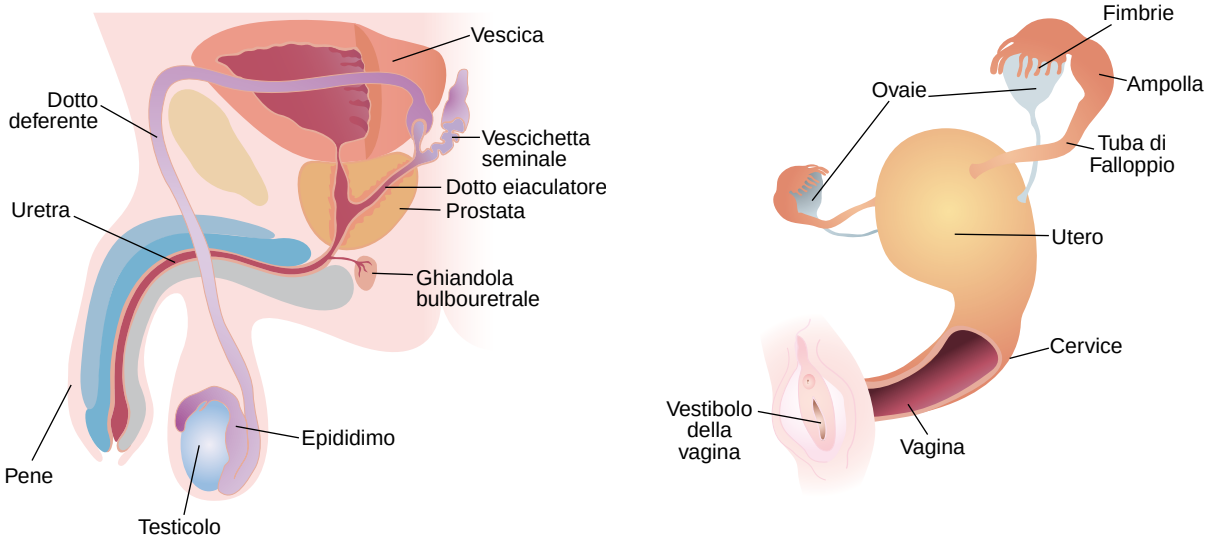
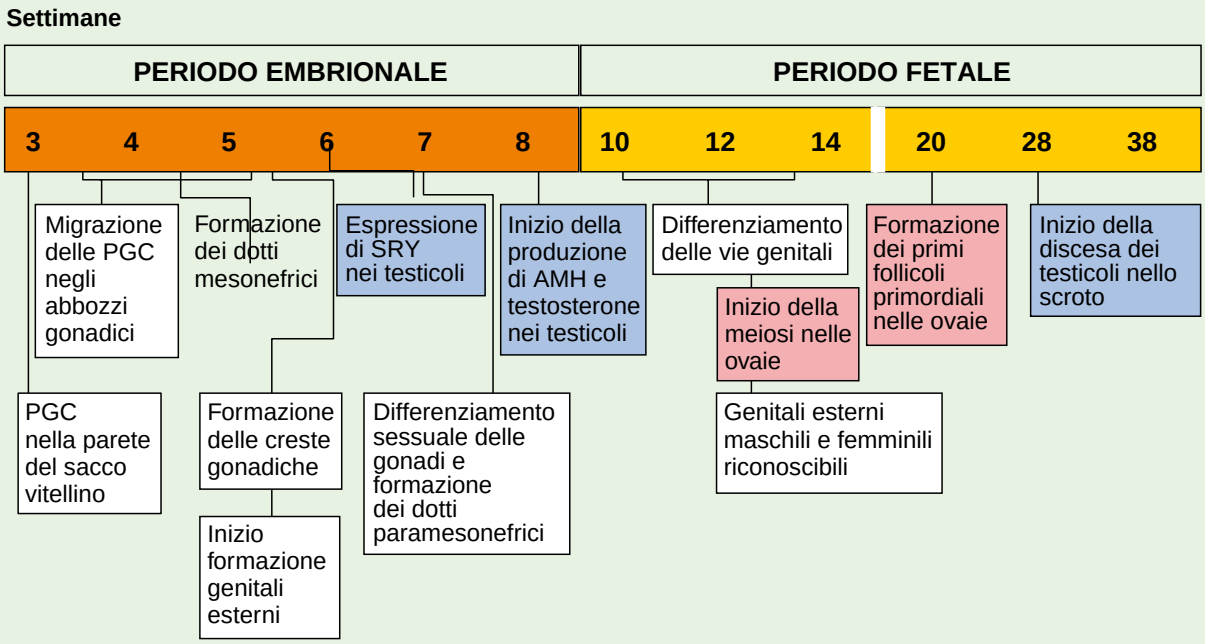



**Figura 16-1** ■ Gli organi dell'apparato riproduttore maschile e femminile.

## TABELLA CRONOLOGICA DELLO SVILUPPO TEMPORALE DELLE GONADI E DELLE VIE GENITALI




stnatale e nell'individuo adulto. Pertanto in questo testo, la gametogenesi verrà suddivisa in tre periodi: embrio-fetale, neonatale-puberale e adulto.

I processi della gametogenesi che avvengono nel periodo embrio-fetale verranno trattati in questo capitolo, mentre quelli che avvengono negli altri due periodi sono trattati nei Capitoli 6 e 7.

Con l'importante eccezione della formazione delle cellule germinali primordiali, la gametogenesi avviene all'interno di organi, le **gonadi**, ovvero i **testicoli** nel maschio e le **ovaie** nella donna, che fanno parte del sistema riproduttore. Oltre alle gonadi, questo apparato è costituito dalle **vie genitali** e dagli **organi genitali esterni** (Fig. 16-1). Come vedremo in questo capitolo, la formazione delle cellule germinali e delle gonadi nel periodo embrio-fetale è centrale per lo sviluppo dell'apparato riproduttore. Dopo la nascita altri organi che non fanno parte dell'apparato riproduttore, in particolare la ghiandola **ipofisi**, assumono un ruolo cruciale per il completo sviluppo e corretto funzionamento di questo apparato.

## GAMETOGENESI E FORMAZIONE DELLE GONADI E DELLE VIE GENITALI NEL PERIODO EMBRIO-FETALE

### Le cellule germinali primordiali

In entrambi i sessi, verso la fine della 3ª settimana di sviluppo embrionale, in una regione sita nell'angolo tra l'allantoide e il sacco vitellino (due piccoli organi che fanno parte degli annessi embrionali, vedi Capitoli 9 e 10), è possibile riconoscere un piccolo gruppo di 50-100 cellule. Si tratta delle cellule germinali primordiali (PGC) ovvero delle cellule da cui avranno origine i gameti (Figg. 16-2 e 16-3). Durante le due-tre settimane seguenti, le PGC proliferano e si spostano nelle gonadi in via di formazione all'interno dell'embrione. Nelle gonadi, esse continuano a proliferare per poi differenziare, a seconda del sesso dell'embrione, in **ovogoni** nell'ovaio e **prospermatogoni/gonociti** nel testicolo (Figg. 16-4 e 16-5).

### La formazione delle gonadi indifferenti

Durante la 5ª settimana nelle lamine di mesoderma laterale più vicine all'intestino primitivo chiamate splancnopleure, e in posizione ventrale a ridosso del mesonefro (vedi avanti), si formano due ispessimenti longitudinali, uno per lato, chiamati **creste gonadiche** che rappresentano gli abbozzi delle gonadi (Fig. 16-5). Le PGC giunte nelle creste gonadiche sono rapidamente circondate da cellule somatiche che originano in seguito alla proliferazione delle cellule della splancnopleura della cresta (chiamate anche epitelio celomatico). Si formano così i **cordoni sessuali primitivi**. Allo stesso tempo cellule provenienti dal mesenchima circostante (derivante dal mesoderma intermedio) e dal mesonefro, penetrano nelle creste contribuendo alla formazione degli altri tipi di cellule somatiche della gonade. Fino alla fine della 6ª settimana di sviluppo, le gonadi maschili (testicoli) e quelle femminili (ovaie) sono morfologicamente indistinguibili. Pertanto questo stadio di sviluppo della go-

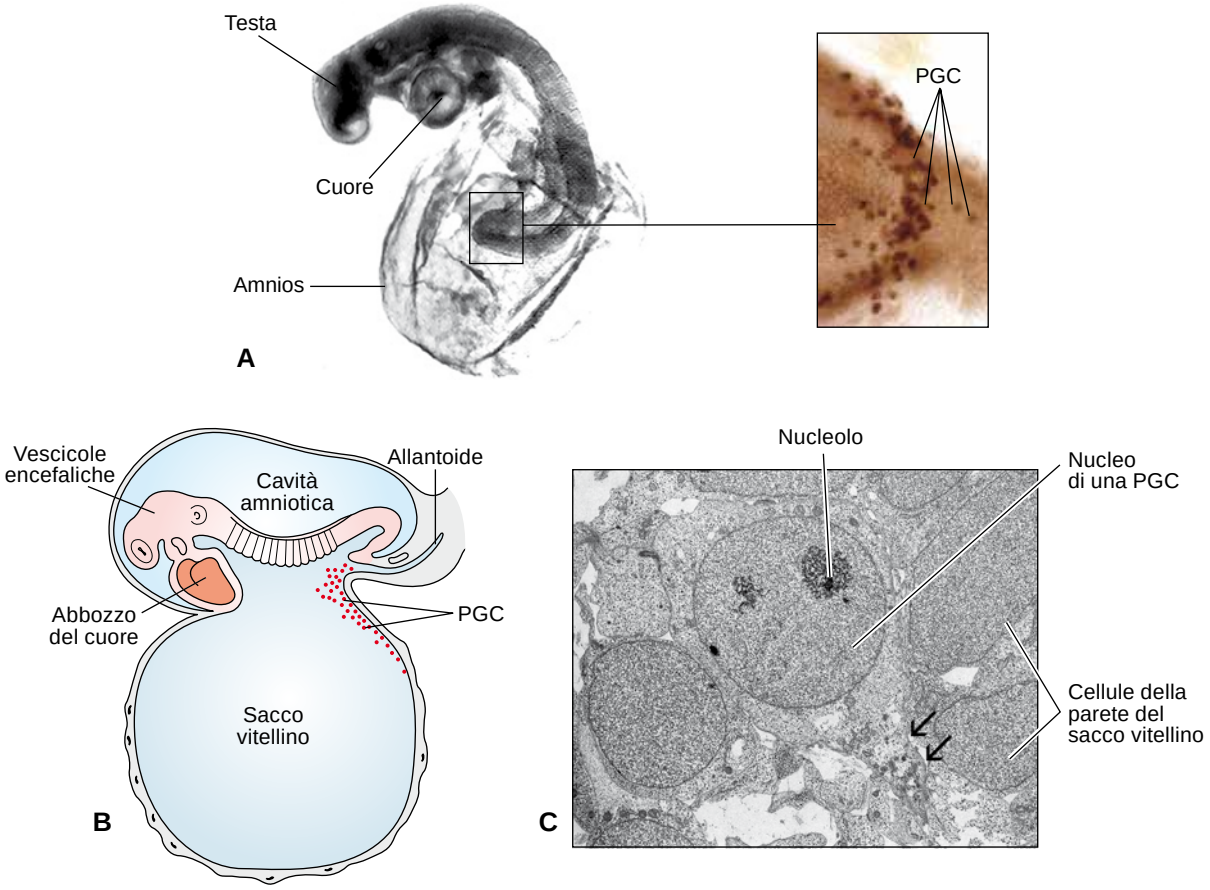



**Figura 16-2** ■ *A)* Embrione umano di circa 21 giorni con l'amnios parzialmente rimosso, il riquadro indica la posizione delle cellule germinali primordiali; nell'inserto la colorazione evidenzia cellule germinali primordiali positive per la reazione all'enzima fosfatasi alcalina. *B)* PGC nella parete del sacco vitellino in un embrione di circa 21 giorni. *C)* Fotografia al TEM (microscopio elettronico a trasmissione) di una cellula germinale primordiale nella parete del sacco vitellino; le frecce indicano uno pseudopodio emesso dalla PGC.

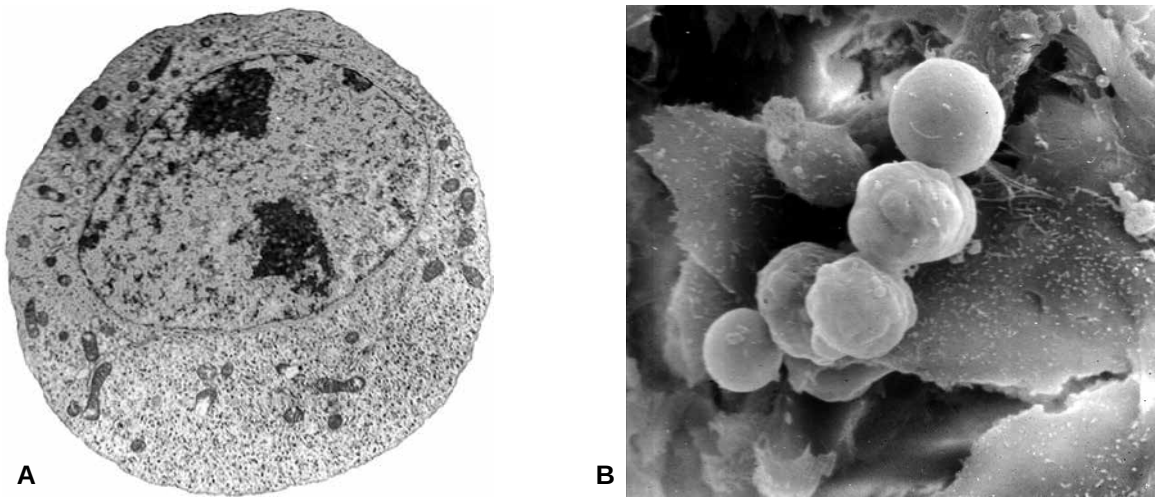



**Figura 16-3** ■ *A)* Cellula germinale primordiale isolata da un embrione di topo e fotografata al microscopio elettronico a trasmissione. *B)* Un gruppo di cellule germinali primordiali (cellule tonde) di topo appena arrivate nelle creste gonadiche e adese ad una cellula somatica della gonade (cellula piatta).

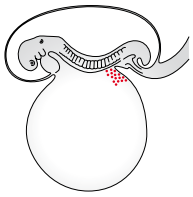
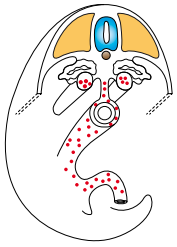
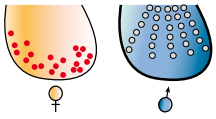
| Settimane di sviluppo | | |
|---|---|---|
| 3ª | PGC nella parete del sacco vitellino |  |
| 4ª | PGC in migrazione nel mesentere dorsale | |
| 5ª | | |
| 6ª | PGC colonizzano le gonadi |  |
| 7ª | PGC differenziano in ovogoni (ovaio) e prospermatogoni (gonociti) testicolo | |
| 8ª | Differenziamento delle gonadi indifferenti in testicoli o ovaie | |
| 9ª | | |
| 10ª | |  |

**Figura 16-4** ■ Periodi di sviluppo delle PGC nell'embrione umano.

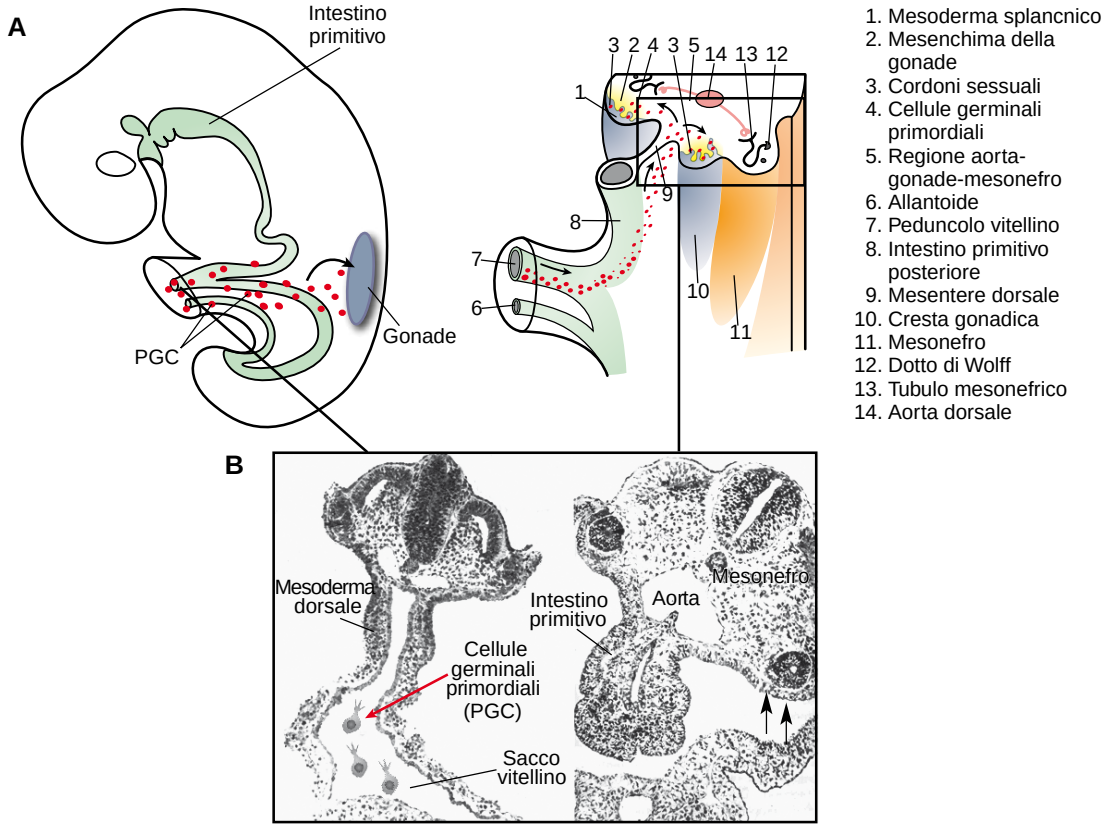



**Figura 16-5** ■ *A)* Migrazione delle PGC dalla parete del sacco vitellino all'interno dell'embrione e formazione dell'abbozzo gonadico dal mesoderma splancnico e dal mesoderma intermedio ventralmente al mesonefro. *B)* Sezioni della regione AGM (aorta-gonade-mesonefro) di embrioni umani che le PGC (qui disegnate nei pressi del sacco vitellino) attraversano per portarsi all'interno delle creste gonadiche; le frecce indicano una cresta gonadica nella parete del celoma.

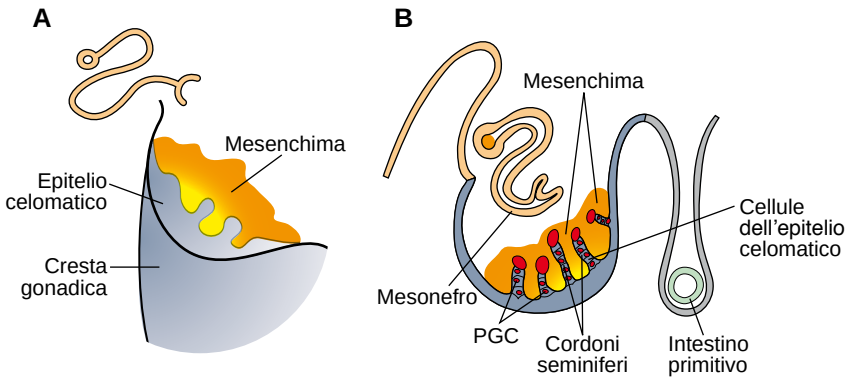



**Figura 16-6** ■ Formazione della gonade indifferente. *A)* La cresta gonadica situata ventralmente al mesonefro è formata da mesenchima rivestito dall'epitelio celomatico. *B)* Dopo la colonizzazione da parte delle PGC, la gonade indifferente contiene i cordoni sessuali primitivi formati da cellule germinali primordiali (in rosso) e cellule somatiche (in grigio). Tra i cordoni permane il mesenchima.

nade viene definito **gonade indifferente** o **bipotente** (Fig. 16-6). Gli eventi successivi del differenziamento sessuale delle gonadi dipendono da geni siti sul cromosoma sessuale Y nel maschio e su altri cromosomi sia nel maschio che nella femmina (vedi paragrafo "Processi e molecole").

## Il differenziamento dei testicoli

A partire dalla 7ª settimana ha inizio il differenziamento delle gonadi indifferenti in senso maschile. I cordoni sessuali primitivi perdono contatto con l'epitelio celomatico e, sviluppandosi nella regione più interna della gonade, chiamata midollare, si definiscono nettamente, trasformandosi in **cordoni seminiferi**. Le cellule germinali primordiali all'interno dei cordoni si differenziano in **prospermatogoni** (chiamati anche **gonociti)** (Figg. 16-7 e 16-8).

Al termine di un periodo di proliferazione che si conclude verso il 5° mese di vita fetale, i prospermatogoni escono dal ciclo cellulare ed entrano in G0. Nel testicolo in formazione, i prospermatogoni vengono circondati dalle **cellule del Sertoli** originate dalla splancnopleura che si dispongono a formare la parete dei **cordoni seminiferi**. I cordoni seminiferi formano caratteristiche anse con andamento a ferro di cavallo, le cui porzioni terminali si ramificano ed anastomizzano nella regione chiamata **ilo del testicolo** (regione posteriore) formando la **rete testis**. Intorno ai cordoni si differenziano cellule muscolari lisce, le **cellule mioidi**, provenienti probabilmente dal vicino mesonefro. Negli spazi tra i cordoni si differenziano gruppi di cellule con funzioni endocrine, le **cellule interstiziali di Leydig**, anch'esse probabilmente provenienti dal mesonefro (Figg. 16-7, 16-8 e 16-9). Le cellule del Sertoli, le cellule del Leydig e le cellule mioidi sono le principali cellule somatiche del testicolo.

I cordoni seminiferi vengono separati dall'epitelio celomatico da uno strato di tessuto connettivo che forma la **tunica albuginea** del testicolo. Durante il successivo sviluppo, l'epitelio celomatico si appiattisce per formare il mesotelio (rivestimento peritoneale) che riveste la superficie del testicolo definitivo. Le cellule del Sertoli e le cellule del Leydig producono rispettivamente una proteina chiamata **fattore anti-mülleriano** (AMH, antimüllerian hormone) e un ormone steroideo, il **testosterone**, necessari allo sviluppo del testicolo, delle vie genitali e dei genitali esterni maschili (vedi paragrafo "Processi e molecole"). Da una posizione intraddominale, durante la 20ª settimana di sviluppo dell'embrione, i testicoli discendono attraverso i canali inguinali fino allo scroto, una sacca muscolo-cutanea, che accoglie ciascun testicolo.

## Il differenziamento delle ovaie

Le ovaie non sono morfologicamente identificabili fino alla 10ª settimana. Le cellule germinali primordiali incorporate all'interno dei cordoni sessuali primitivi delle gonadi indifferenti si differenziano in **ovogoni** (Fig. 16-10). Gli ovogoni proliferano più intensamente dei prospermatogoni; il loro numero complessivo nelle ovaie intorno al 5° mese è stimato in circa 5-7 milioni. Terminata la fase mitotica numerosi ovogoni degenerano, mentre i rimanenti iniziano la fase meiotica. Gli ovogoni che hanno iniziato la prima divisione meiotica sono ora chiamati **ovociti primari**. È da notare che l'ingresso in meiosi degli ovogoni è un evento graduale e asincrono; già dalla fine del terzo mese, osservando la morfologia dei nuclei, è possibile identificare alcuni ovociti primari nei primi stadi della profase meiotica I. Sulla base della diversa morfologia dei cromosomi sono riconoscibili quattro stadi della profase meiotica I, chiamati **leptotene**, **zigotene**, **pachitene** e **diplotene** (vedi Capitolo 5) (Fig. 16-11). Raggiunto lo stadio di diplotene, al termine della profase I, gli ovociti entrano in un periodo d'arresto della meiosi chiamato **dictiotene** o **dictiato** caratterizzato dalla decondensazione dei cromosomi e dalla lunga durata (fino a quaranta anni!) (vedi Capitolo 7). Quando i primi ovociti hanno raggiunto lo stadio di diplotene (quarto mese), coesistono

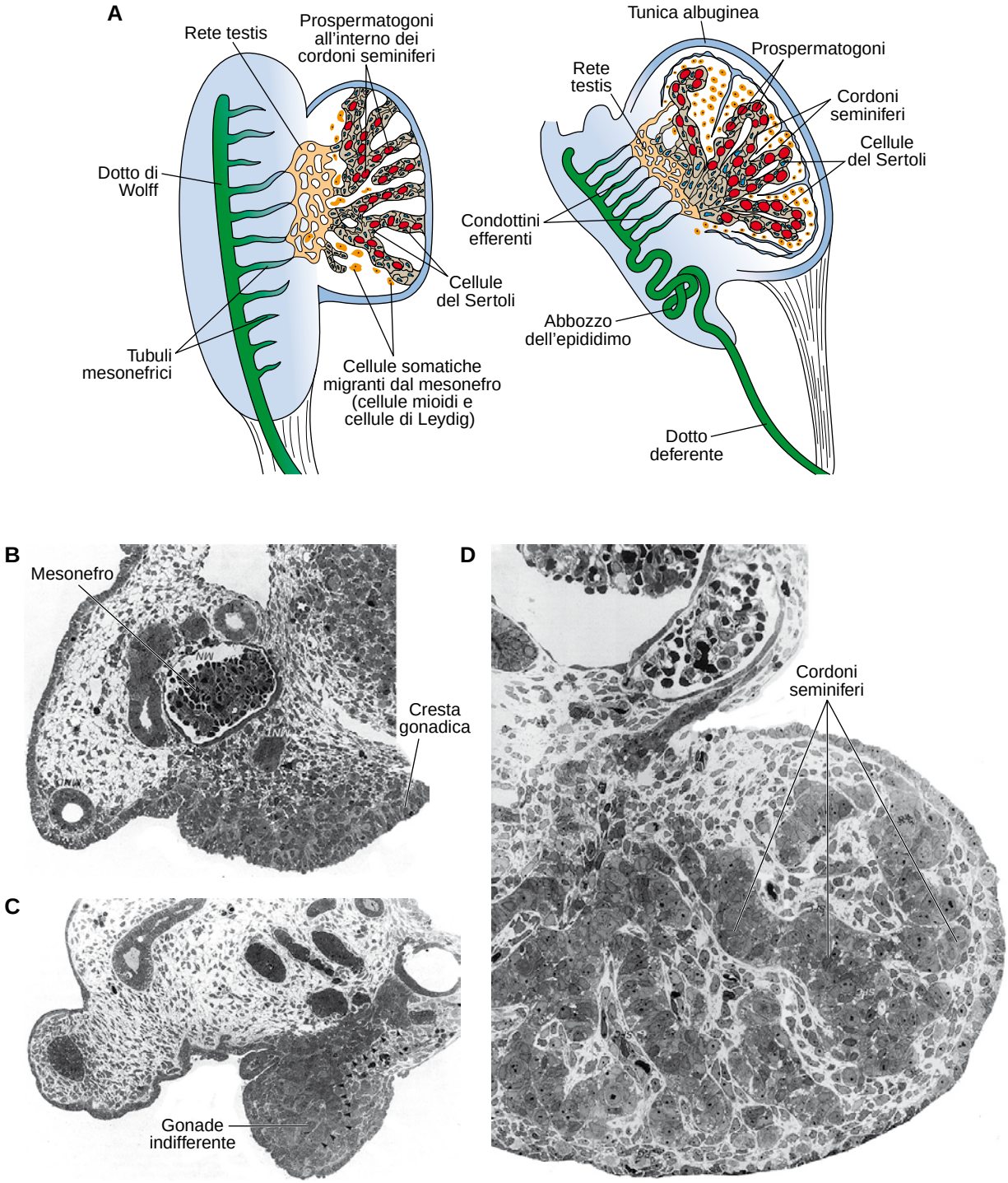



**Figura 16-7** ■ *A)* Differenziamento del testicolo; all'interno dei cordoni le cellule somatiche si differenziano in cellule del Sertoli (in blu) e le PGC si differenziano in prospermatogoni (in rosso). Il tessuto mesenchimale dà origine alle cellule del Leydig e alle cellule mioidi-peritubulari. Notare la derivazione delle vie genitali maschili dal mesonefro. *B-D)* Micrografie di tre stadi differenziativi del testicolo in un embrione umano (dalla 5ª alla 10ª settimana): *B*) cresta gonadica; *C)* gonade indifferente; *D)* testicolo riconoscibile per la presenza di cordoni seminiferi; le cellule di maggiore dimensione sono prospermatogoni.

nell'ovaio fetale ovogoni e ovociti in tutti gli stadi della profase I. Come gli ovogoni, numerosi ovociti primari degenerano durante la profase I soprattutto allo stadio di pachitene/diplotene. La degenerazione degli ovogoni e degli ovociti in queste fasi è un processo ancora non del tutto compreso e chiarito nei suoi meccanismi mo-

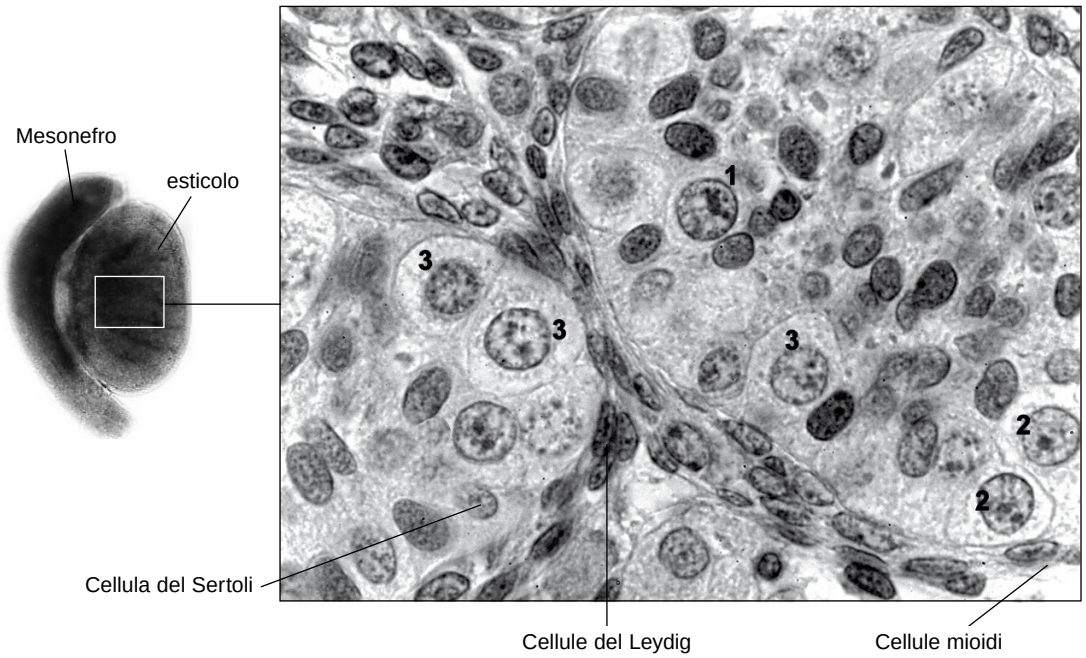



**Figura 16-8** ■ Testicolo di un embrione di topo di circa 14 giorni, corrispondente a circa la 7ª-8ª settimana nell'uomo. Il mesonefro è visibile, attaccato alla regione dorsale. A destra foto al microscopio ottico di cordoni seminiferi, i numeri 1, 2, 3 indicano alcuni prospermatogoni/gonociti all'interno di cordoni seminiferi.

lecolari e verrà discusso più avanti nel paragrafo "Processi e molecole".

Allorché gli ovociti raggiungono lo stadio di dictiotene vengono circondati dalle cellule somatiche dei cordoni sessuali chiamate **pre-follicolari** o **pre-granulosa**. Si vengono così a differenziare tra il quinto e il nono mese di sviluppo fetale, i **follicoli primordiali** formati da 4-5 cellule follicolari appiattite che racchiudono un ovocito

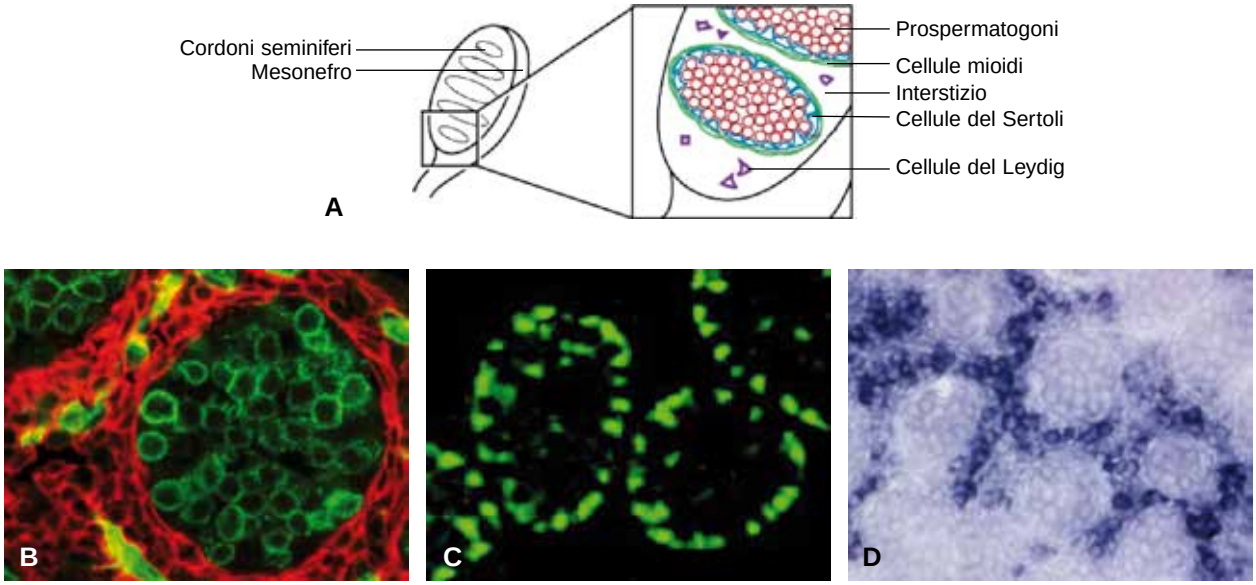



**Figura 16-9** ■ *A)* Schema di un testicolo in formazione in cui viene messa in evidenza l'organizzazione di un cordone seminifero. *B-D)* Identificazione con anticorpi fluorescenti delle tre principali popolazioni cellulari in via di differenziamento in un testicolo di topo. *B)* Prospermatogoni (in verde) al centro di un cordone seminifero. *C)* Cellule del Sertoli (in verde). *D)* Cellule del Leydig (in viola). (Da: D. Wilhelm, S. Palmer, P. Koopman, Sex determination and gonadal development in mammals, Physiol. Rev. 87, 1-28, 2007; doi:10.1152/physrev.00009.2006, per gentile concessione di The American Physiological Society).

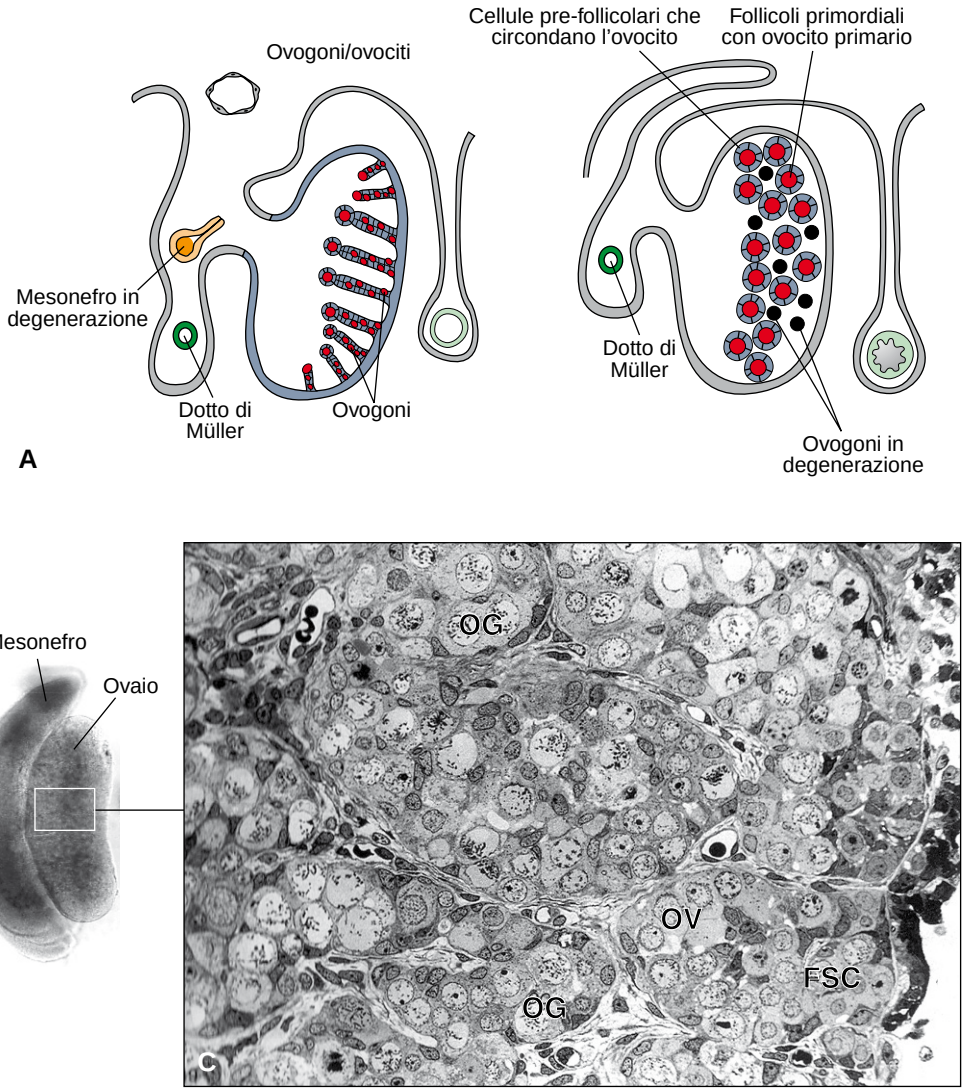



**Figura 16-10** ■ Differenziamento dell'ovaio. *A)* I cordoni sessuali secondari sono formati da cellule somatiche e da ovogoni in fase proliferativa. Solo dopo l'ingresso in meiosi e l'arresto allo stadio di dictiato ciascun ovocito primario viene circondato dalle cellule follicolari dando origine ai follicoli primordiali. *B,C)* Un ovaio fetale e una fotografia al microscopio ottico in cui sono riconoscibili cordoni sessuali secondari con numerosi ovogoni (OG), qualche ovocito (OV) e cellule pre-follicolari (FSC).

primario in diplotene. Il tessuto situato tra i follicoli primordiali è definito tessuto interstiziale, ricco di vasi e nervi, e darà origine ai rivestimenti connettivali dei follicoli (teche). L'ovaio viene rivestito da un epitelio monostratificato, derivato dall'epitelio celomatico, a cui si accompagna il connettivo che formerà la tunica albuginea dell'ovaio. L'epitelio di rivestimento dell'ovaio è chiamato **OSE** (ovarian surface epithelium) o epitelio germinativo, in quanto si pensava che da esso derivassero gli ovociti.

Prima della nascita le ovaie discendono dalla parete addominale posteriore fino alle pelvi. Alla nascita, a seguito dei processi degenerativi e differenziativi sopra descritti, nelle due ovaie si contano complessivamente circa 1.000.000 follicoli primordiali contenenti ciascuno un ovocito primario allo stadio di diplotene.

## Formazione delle vie genitali interne

Come per le gonadi, la formazione delle vie genitali inizia nello stesso modo sia nel maschio che nella femmina. Durante la 4ª settimana ciascun mesonefro (rene primitivo transitorio che origina dal mesoderma intermedio, vedi più avanti) sviluppa un cordoncino di cellule che si canalizza e diventa il **dotto mesonefrico** o **di Wolff**. Ciascun dotto, decorrendo in posizione dorsolaterale rispetto ai tubuli mesonefrici, procede in direzione caudale e sbocca nella cloaca. Alla 6ª settimana sul lato esterno di ciascun dotto di Wolff, una piega del mesoderma laterale splancnico dà origine al **dotto paramesonefrico** o **di Müller** (Fig. 16-12). L'estremità superiore di ciascun dotto si apre nel celoma, mentre quella inferiore passa sopra il dotto di Wolff e si unisce a quella del dotto di Müller controlaterale. I due dotti termi-

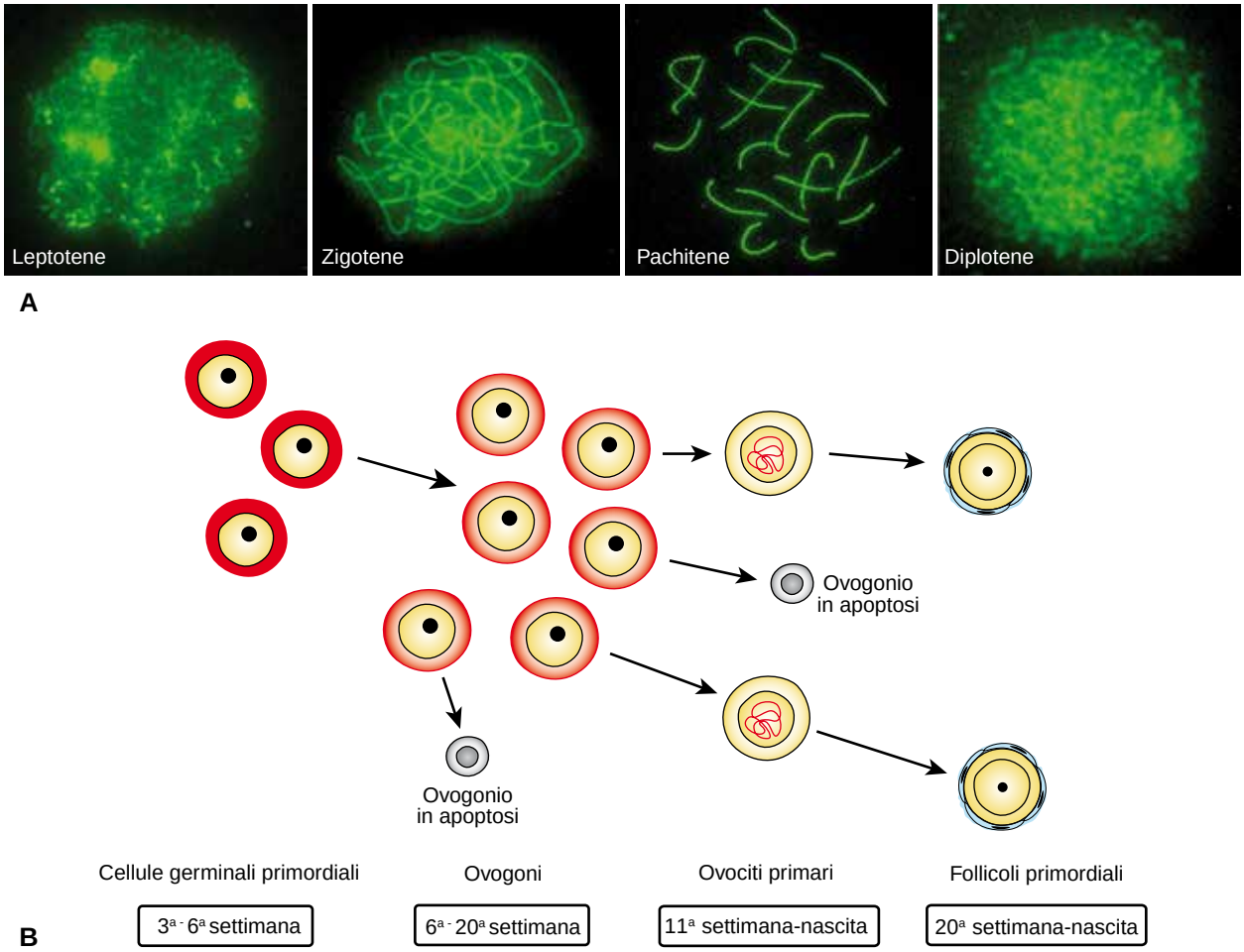



**Figura 16-11** ■ *A)* Cromosomi di ovociti meiotici di topo colorati con un anticorpo fluorescente che riconosce una proteina (SCP3) del complesso sineptinemale (vedi Capitolo 4) nelle quattro fasi della profase meiotica I (per gentile concessione di F. Klinger). *B)* Cronologia dello sviluppo e differenziamento delle cellule germinali femminili durante il periodo embrionale e fetale.

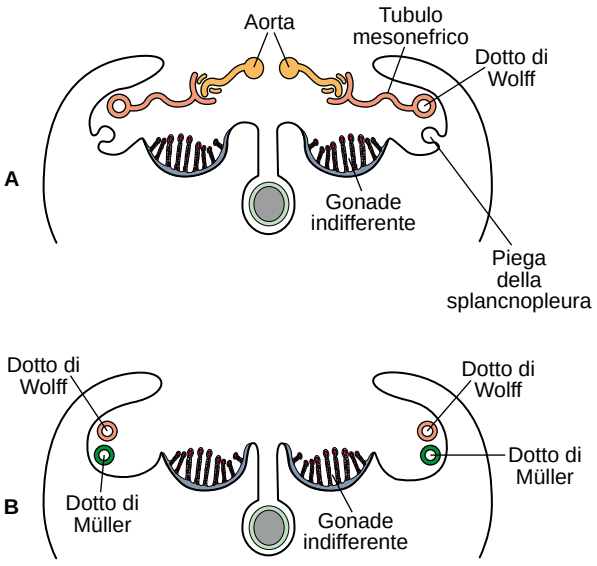



**Figura 16-12** ■ Formazione dei dotti paramesonefrici o di Müller dalla splancnopleura.

nano uniti sulla parete dorsale del seno urogenitale formando il **tubercolo di Müller** (vedi più avanti). Fino alla 6ª settimana sono presenti contemporaneamente due paia di dotti (mesonefrici e paramesonefrici) in entrambi i sessi (fase bipotente o indifferente) (Fig. 16-13). A partire dalla 7ª settimana lo sviluppo dei dotti di Wolff e di Müller prende una direzione diversa a seconda del sesso dell'embrione.

La formazione delle vie genitali è controllata da ormoni e polipeptidi della famiglia dei fattori di crescita. Verso l'8ª settimana le cellule del Leydig del testicolo iniziano a secernere due ormoni steroidi (androgeni), il **testosterone** e il **diidrotestosterone**, che inducono il differenziamento del dotto di Wolff in epididimo, dotto deferente e dotto eiaculatore e lo sviluppo della prostata e dei genitali esterni maschili (scroto, pene e uretra peniena). Le cellule del Sertoli secernono una glicoproteina detta **ormone antimülleriano** (AMH, antimüllerian hormone o MIS, müllerian inhibitory substance) che induce la regressione dei dotti di Müller (vedi paragrafo "Processi e molecole").

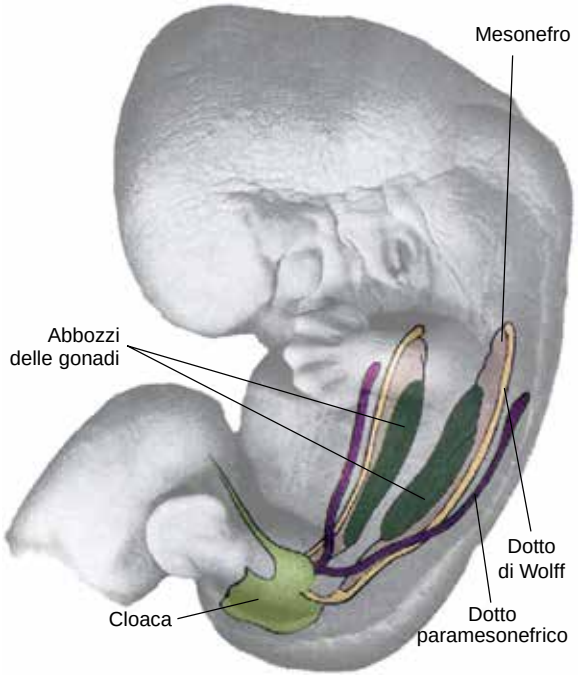



**Figura 16-13** ■ Vie genitali nella fase indifferente (5ª-6ª settimana).

## Formazione delle vie genitali maschili e delle ghiandole annesse

I condottini efferenti, gli epididimi, i dotti deferenti e i dotti eiaculatori costituiscono le vie genitali maschili completate dall'**uretra** (divisa in due tratti principali chiamati uretra prostatica e peniena) e dalle **ghiandole annesse** (vescichette seminali, prostata, ghiandole bulbo uretrali). Le vie genitali rappresentano un sistema di dotti dove gli spermatozoi, prodotti nel testicolo, si accumulano e vengono trasportati verso l'esterno. Dopo la formazione dai prolungamenti dei cordoni seminiferi, la rete testis prende contatto con 15-20 tubuli del mesonefro che diventano i condottini efferenti. Questi sono connessi col dotto di Wolff che diviene l'epididimo nella sua porzione più vicina (prossimale) al testicolo e dotto deferente nella sua porzione più lontana (distale) (Figg. 16-7 e 16-14). Ventralmente alla vescica in via di formazione dal seno urogenitale (una porzione del tratto terminale dell'intestino primitivo chiamato cloaca, vedi più avanti) i deferenti si aprono attraverso i dotti eiaculatori nell'uretra prostatica che si continua con l'uretra peniena. In prossimità dell'apertura dei dotti di Wolff nell'uretra prostatica, hanno origine le **vescichette seminali.** Il dotto eiaculatore è dunque la porzione del dotto di Wolff compresa tra le vescichette seminali e l'uretra prostatica (Fig. 16-15). Sotto l'azione del diidrotestosterone la **prostata** origina intorno alla 10ª settimana come un'evaginazione dell'epitelio endodermico che riveste la porzione ventrale del seno urogenitale da cui si sviluppa anche l'uretra prostatica. Il successivo sviluppo della ghiandola prostatica è il risultato di reciproche interazioni tra cellule epiteliali che formano i tubuli ghiandolari secernenti e cellule mesenchimali che danno origine allo stroma e alla muscolatura liscia della ghiandola. Subito sotto la prostata l'uretra dà origine anche a due **ghiandole bulbouretrali** (Fig. 16-15). La porzione distale dell'uretra è detta uretra peniena e origina dalla fusione delle pieghe uretrali (vedi più avanti).

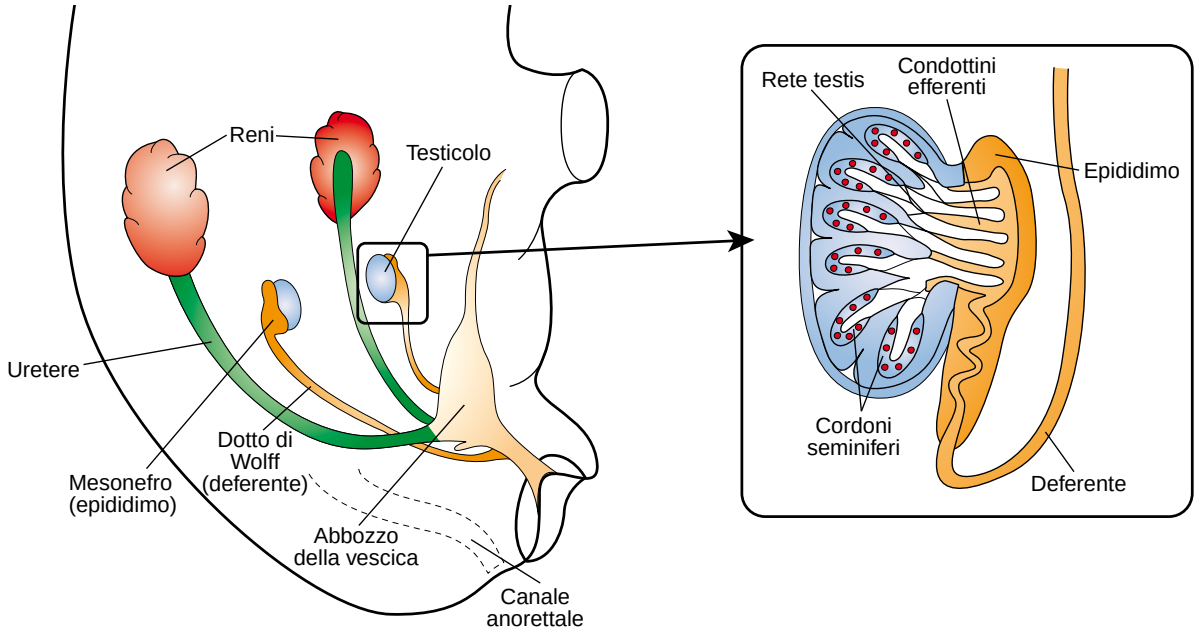



**Figura 16-14** ■ Rapporti tra vie urinarie e vie genitali nel maschio. Nell'inserto è mostrato in dettaglio il testicolo e le vie genitali prossimali.

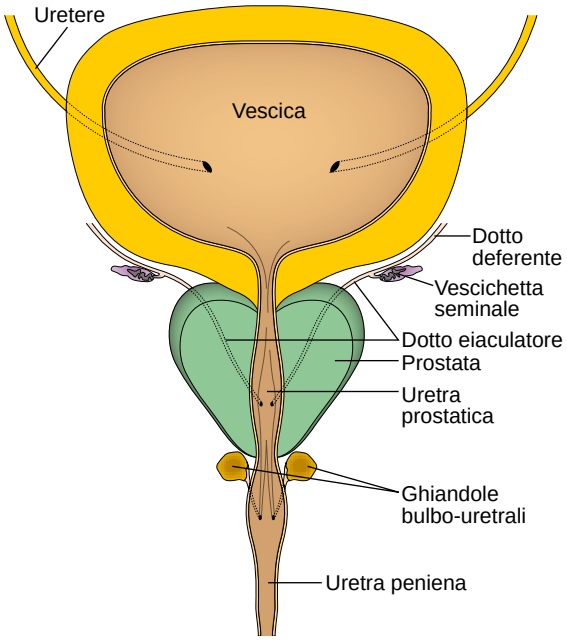



**Figura 16-15** ■ Formazione dell'uretra e delle ghiandole annesse (vescichette seminali, prostata e ghiandole bulbo uretrali). Notare che le vescichette seminali sono di derivazione mesodermica, mentre uretra, prostata e ghiandole bulbo uretrali sono di derivazione endodermica.

## Formazione delle vie genitali femminili

Le vie genitali femminili sono rappresentate dai due ovidutti o tube del Falloppio, dall'utero e dalla vagina. Da ciascun lato a fianco del dotto di Wolff, ma completamente indipendente da esso, si forma un altro dotto longitudinale, **dotto paramesonefrico o di Müller**, per un processo di invaginazione dell'epitelio celomatico e successiva chiusura della piega (Fig. 16-12). La porzione più craniale di ciascun dotto di Müller diventa **ovidutto** che si apre con l'estremità cefalica nel celoma vicino all'ovaio. Procedendo in direzione caudale verso il seno urogenitale, ciascun dotto si sposta verso la linea mediana, incrocia il dotto di Wolff, si incontra con il suo controlaterale e si fonde con esso. Dal processo di fusione dei dotti di Müller si forma l'**utero** e la regione superiore della **vagina** (Figg. 16-16 e 16-17). La regione inferiore della vagina origina dal seno urogenitale, che a sua volta deriva dalla cloaca. Infatti i due dotti di Müller terminano fusi sulla parete posteriore del seno urogenitale inducendo la proliferazione cellulare del rivestimento endodermico e la formazione di un abbozzo inizialmente non canalizzato. In seguito, il lume dell'utero si continuerà con quello del canale della vagina che a sua volta si aprirà nel vestibolo della vagina (Fig. 16-18).

## Formazione degli organi genitali esterni

Anatomicamente i genitali esterni maschili comprendono il pene, l'uretra peniena e lo scroto. I genitali esterni femminili comprendono le piccole labbra, le grandi labbra, il clitoride e il vestibolo della vagina. Nel primo periodo di sviluppo, dalla 5ª alla 8ª settimana, la morfologia dei genitali esterni è molto simile negli embrioni dei due sessi (stadio indifferente). Alla fine della 5ª settimana, ai lati della membrana cloacale si sviluppano due rilievi, chiamati **pieghe cloacali**, che anteriormente si fondono per dar luogo al **tubercolo genitale** (Fig. 16-19).

Durante la 7ª settimana, il **setto urorettale** separa la membrana anale in membrana urogenitale ventralmente e membrana anale dorsalmente. Allo stesso tempo le pieghe cloacali vengono suddivise in **pieghe uretrali** e **pieghe anali**. Più esternamente e ai lati delle pieghe uretrali si sviluppano due rilievi chiamati **rigonfiamenti genitali** (o cercini labio-scrotali). Contemporaneamente la membrana urogenitale si perfora, aprendo la cavità del seno urogenitale verso l'esterno. Il differenziamento dei genitali esterni in senso maschile o femminile è visibile dopo la 12ª settimana ed è un processo ormone-dipendente (vedi paragrafo "Processi e molecole").

Nel maschio il tubercolo genitale si allunga formando il **pene**, le pieghe uretrali si fondono, racchiudendo l'orifizio del seno urogenitale (doccia uretrale), e formano l'**uretra peniena**. L'estremità anteriore di tale via,

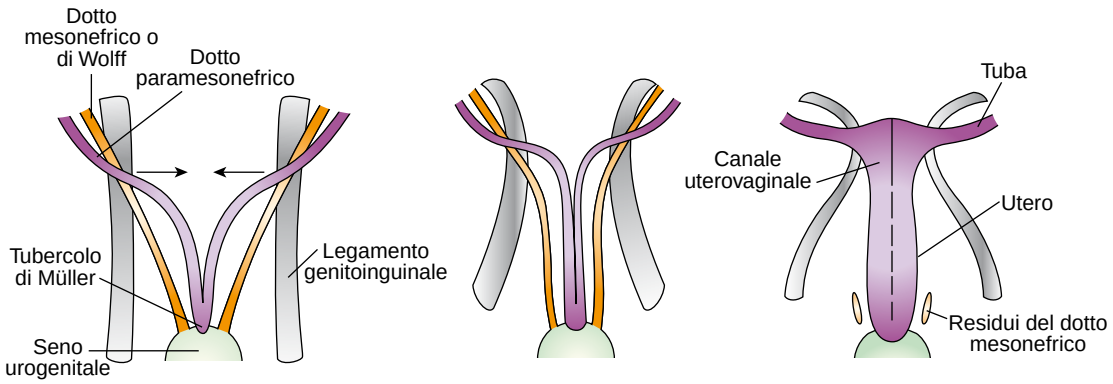



**Figura 16-16** ■ Formazione degli ovidutti e dell'utero dai dotti paramesonefrici.

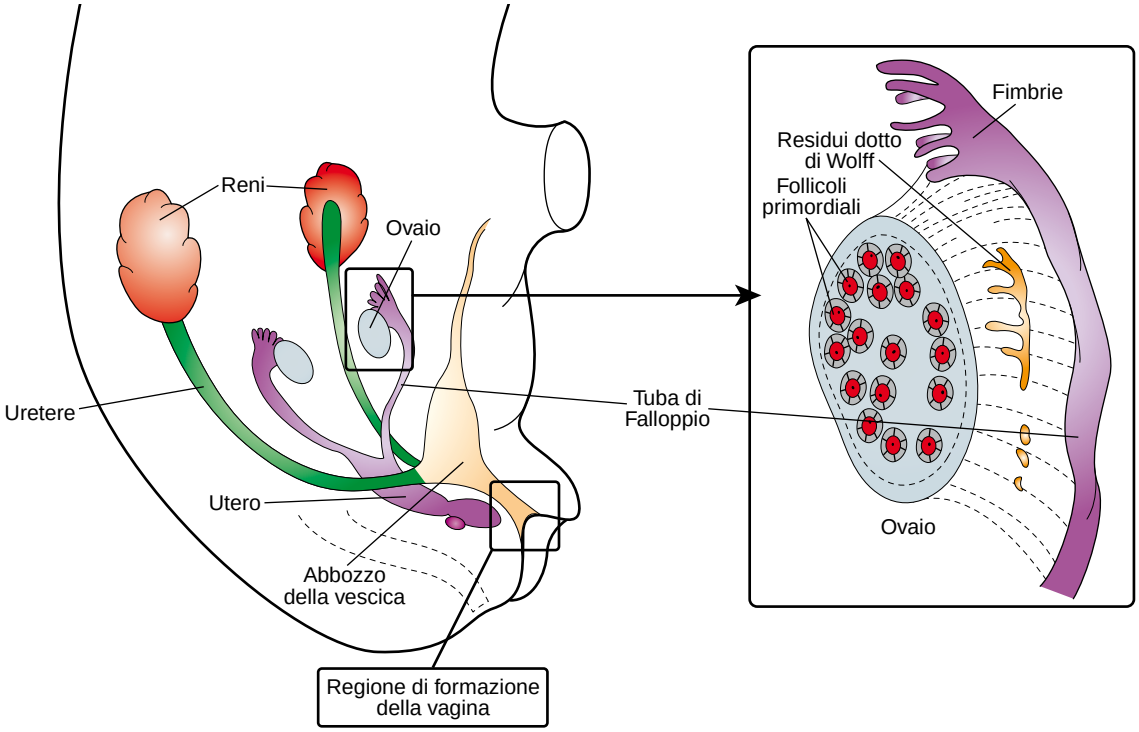



**Figura 16-17** ■ Rapporti tra vie urinarie e vie genitali nella femmina. Nell'inserto è disegnato l'ovaio e l'ovidutto intorno all'8° mese di vita fetale.

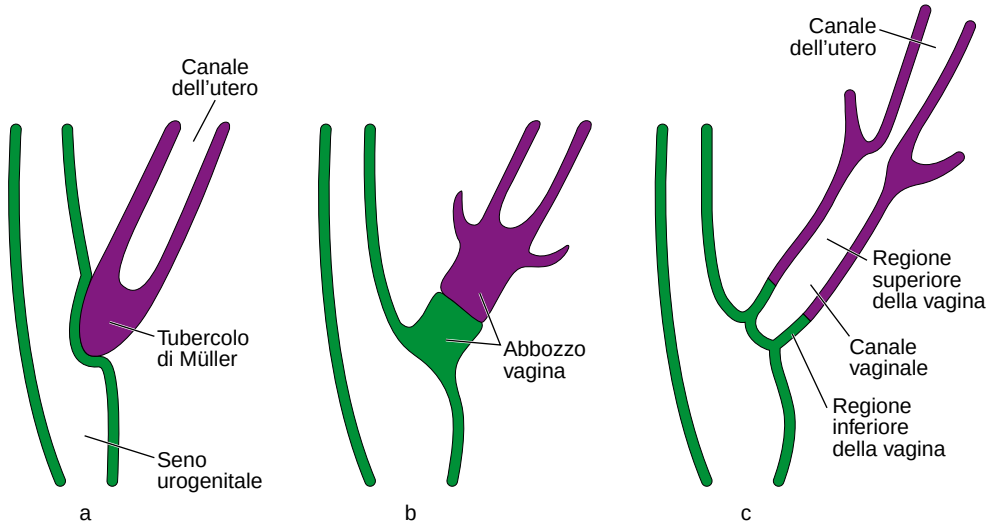



**Figura 16-18** ■ Formazione della vagina. La porzione inferiore (in verde) è di origine endodermica, mentre la porzione superiore (in viola) è di origine mesodermica.

inizialmente chiusa, si apre successivamente grazie ad un'invaginazione ectodermica della punta del glande. I rigonfiamenti genitali si fondono sulla linea mediana e formano lo **scroto** che intorno alla nascita accoglierà i testicoli dopo il processo di discesa dalla regione lombare.

Nella femmina, il tubercolo genitale si accresce in modo limitato rispetto al maschio e forma il **clitoride**. La cavità del seno urogenitale definitivo si differenzia in **vestibolo della vagina**. Le pieghe uretrali, che a differenza del maschio rimangono separate, formano le **piccole labbra** e i rigonfiamenti genitali diventano le **grandi labbra**.

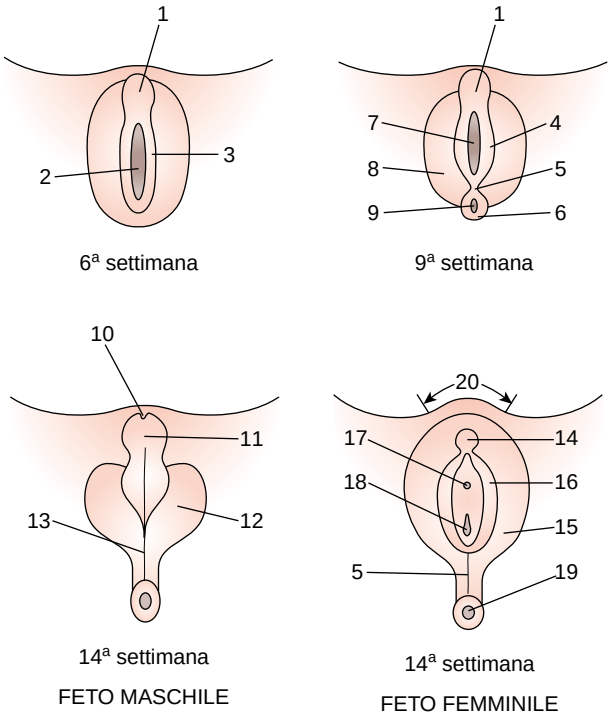



**Figura 16-19** ■ Formazione dei genitali esterni maschili e femminili. 1) tubercolo genitale, 2) membrana cloacale, 3) piega cloacale, 4) piega uretrale, 5) perineo, 6) piega anale, 7) membrana urogenitale, 8) rigonfiamento genitale, 9) membrana anale, 10) doccia uretrale, 11) glande del pene, 12) scroto, 13) rafe scrotale, 14) clitoride, 15) grande labro, 16) piccolo labro, 17) orifizio uretrale, 18) imene, 19) orifizio anale, 20) monte di Venere.

## PROCESSI E MOLECOLE

### *La formazione delle cellule germinali primordiali*

Come sopra descritto le cellule germinali primordiali (PGC) sono le cellule da cui derivano gli ovogoni e i prospermatogoni. La formazione e lo sviluppo di queste cellule sono processi di grande interesse sia perché la trasmissione dei caratteri ereditari di un individuo avviene grazie a queste cellule sia perché in questi ultimi anni si è capito che alcuni dei meccanismi più importanti responsabili della totipotenza/pluripotenza delle cellule staminali sono gli stessi che regolano la formazione delle PGC. Difatti, sta emergendo che il genoma (l'insieme dei geni) delle PGC è strutturato in modo del tutto unico. Mentre le cellule somatiche con il differenziamento perdono la capacità di attivare una gran parte dei loro geni in modo difficilmente reversibile, le PGC possiedono un genoma in cui i geni necessari per lo sviluppo di un nuovo individuo rimangono potenzialmente attivabili. Per questa ragione, nell'embrione dei mammiferi le PGC si formano attraverso una serie di processi del tutto unici. Questi da un parte hanno lo scopo di proteggere il genoma delle PGC da segnali di differenziamento somatico e, dall'altra, lo mantengono in uno stato di plasticità differenziativa tipico delle cellule staminali. Studi nel topo hanno permesso di svelare alcuni dei meccanismi molecolari alla base di questi processi. Nell'embrione di topo, la formazione delle PGC inizia nell'epiblasto intorno al 6° giorno dalla fecondazione prima della gastrulazione. Come mostrato nelle Figure 16-20 e 16-21,

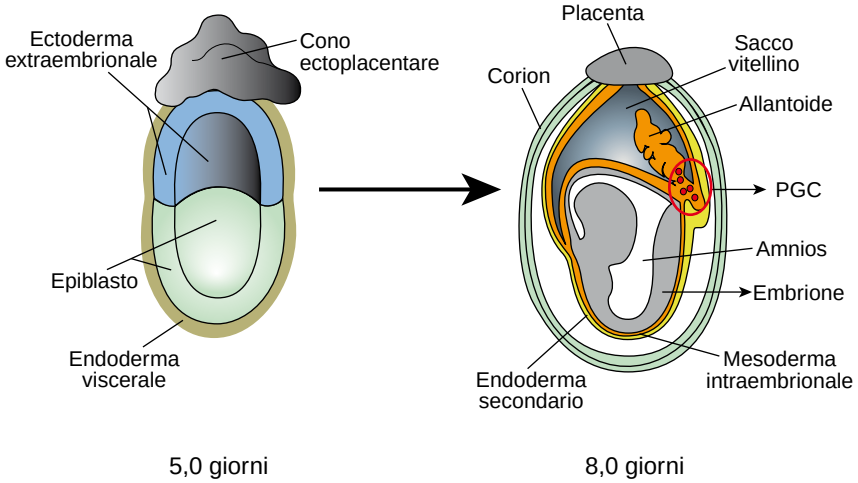



**Figura 16-20** ■ Formazione delle cellule germinali primordiali (PGC) nell'embrione di topo. L'organizzazione dell'embrione di topo in questi stadi è piuttosto diversa dall'uomo *(A)*. In particolare l'epiblasto e l'ipoblasto (equivalente all'endoderma viscerale) formano una coppa e non un disco, dalla cui cavità deriverà la cavità amniotica, mentre il sacco vitellino si localizza al di sopra dell'embrione con l'endoderma all'esterno ed il mesoderma extraembrionale all'interno. Tra l'8° ed il 10° giorno, l'embrione ruota su se stesso ed assume la stessa posizione dell'embrione umano rispetto agli annessi embrionali. *B)* A 8 giorni le PGC sono visibili nella parete del sacco vitellino alla base dell'allantoide; la stessa regione in cui sono visibili negli embrioni umani verso la fine della 3ª settimana.

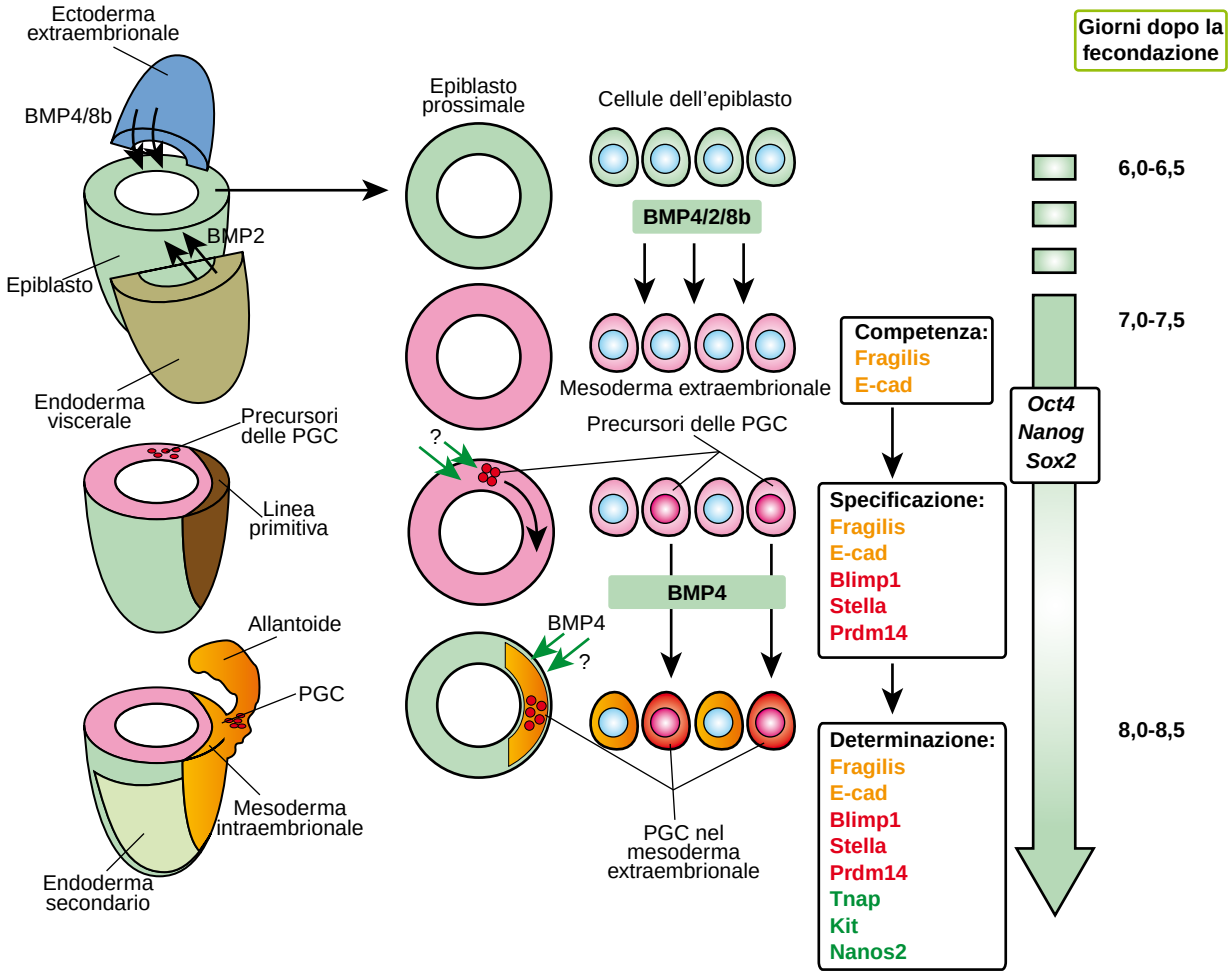



**Figura 16-21** ■ Processi molecolari nella formazione dei precursori delle PGC e delle PGC nell'embrione di topo tra 6,0 e 8,5 giorni di sviluppo.

in una prima fase (**competenza**) fattori di crescita della famiglia dei **BMP** (bone morphogenetic protein), prodotti da tessuti extraembrionali, inducono alcune cellule dell'epiblasto prossimale (più vicino all'amnios) a divenire competenti a differenziare in cellule del mesoderma extraembrionale; l'aumentata espressione dei geni ***Fragilis*** e ***E-cad*** (***E-caderina***) segna questa competenza. Nelle fase seguente (**specificazione**), a seguito di segnali ancora sconosciuti, in una sottopopolazione di tali cellule, si esprime un gene chiamato ***Blimp1*** (B lymphocyte-induced maturation protein 1 o Prmd1, PR, domain containing protein 1). Questo è deputato alla sintesi di una proteina che reprime l'attività di numerosi geni chiave per il differenziamento dei diversi tipi di cellule somatiche. A seguito di tali eventi si formano i precursori delle PGC, ovvero le cellule destinate a dare origine solamente alle PGC. I precursori delle PGC sono caratterizzati dall'espressione di due nuovi geni ***Stella*** e ***Prdm14*** (PR domain containing protein 14), quest'ultimo ha probabilmente la funzione di attivare i geni della totipotenza/pluripotenza come ***Oct4*** (octamer 4), ***Nanog*** (da "Tir na nòg", cioè "terra dell'eterna giovinezza") e ***Sox2*** (SRY-box 2). Contemporaneamente nel nucleo dei precursori avvengono cambiamenti della cromatina (metilazioni e acetilazioni) che contribuiscono all'inibizione di geni del differenziamento somatico e al ripristino della totipotenza del genoma. I precursori delle PGC si spostano quindi nella regione posteriore dell'embrione e, attraverso la linea primitiva in via di formazione, nel mesoderma extraembrionale situato alla base dell'allantoide. In questa regione, essi stimolati dal **BMP4** e probabilmente da **WNT3**, diventano definitivamente PGC (**determinazione**). Queste cellule sono ora caratterizzate dall'espressione di altri geni come quelli che codificano per l'enzima **fosfatasi alcalina** (TNAP, tissue not specific alkaline phosphatase) o per proteine cruciali per il loro successivo sviluppo come il recettore **KIT** e una proteina che lega RNA messaggeri chiamata **Nanos2** (nanos homologus 2).

Nonostante le prime descrizioni morfologiche sulla formazione delle PGC nell'embrione umano risalgano al 1911, lo studio dei meccanismi molecolari coinvolti in tale processo nell'uomo è reso praticamente impossibile dalla non disponibilità di embrioni nei primi stadi di

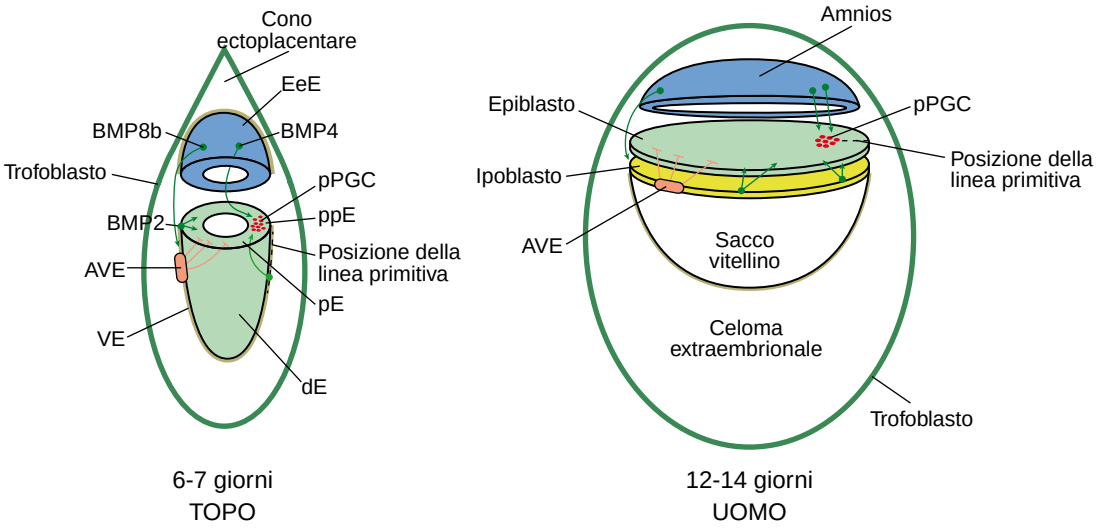



**Figura 16-22** ■ Confronto tra la formazione delle PGC descritta nel topo e quella puramente ipotetica nell'uomo. Notare le importanti differenze nell'organizzazione dei tessuti embrionali ed extraembrionali tra l'embrione del topo e quello umano. pPGC = precursori delle PGC; AVE = endoderma anteriore viscerale; VE = endoderma viscerale; dE = epiblasto distale; pE = endoderma parietale; ppE = epiblasto prossimale posteriore; EeE = ectoderma extraembrionale.

sviluppo. Tuttavia, si possono ipotizzare meccanismi simili a quelli sopra riportati nel topo. Si può ipotizzare che nell'embrione umano le PGC vengano indotte nell'epiblasto verso la fine della 2ª settimana a seguito di segnali da parte di BMP secreti da tessuti limitrofi (ipoblasto e amnios) (Fig. 16-22). Successivamente, i precursori delle PGC si spostano nel mesoderma extraembrionale della parete del sacco vitellino vicina all'origine dell'allantoide. È qui che intorno alla fine della 3ª settimana 50-100 PGC umane possono essere riconosciute sia morfologicamente sia per l'elevata attività dell'enzima TNAP.

## *La degenerazione delle cellule germinali*

In entrambi i sessi, il numero delle cellule germinali primordiali identificabili in un embrione umano verso la fine della 3ª settimana è stimato tra 50 e 100. A seguito della loro proliferazione e successivamente di quella degli ovogoni e dei prospermatogoni il numero delle cellule germinali aumenta notevolmente fino al 5° mese di vita fetale. Nelle due ovaie di un feto di cinque mesi, il numero complessivo delle cellule germinali raggiunge circa 5-7 milioni. Durante la fase proliferativa, non avvengono rilevanti processi degenerativi. Questi iniziano in entrambi i sessi al termine del periodo proliferativo. Mentre nei testicoli non si possiedono dati a riguardo, nelle ovaie la diminuzione del numero delle cellule germinali è stata studiata in modo dettagliato soprattutto nei roditori. Si tratta di processi di degenerazione cellulare che colpiscono sia gli ovogoni che gli ovociti primari e riducono notevolmente il numero delle cellule germinali. Nella donna il numero totale delle cellule germinali (ovociti primari) alla nascita è stimato intorno al milione. Mentre nell'uomo gli spermatogoni dopo la nascita e soprattutto alla pubertà riprendono a proliferare, e sono quindi in grado di formare continuamente nuove cellule germinali, nella donna gli ovociti primari presenti alla nascita hanno già intrapreso la meiosi e di conseguenza hanno perduto la capacità di proliferare e di formare nuove cellule germinali. In sostanza, sebbene recentemente si sia accesa una discussione sull'argomento (vedi paragrafo seguente), è ancora opinione diffusa che il numero delle cellule germinali femminili sia fissato alla nascita e sia destinato a diminuire progressivamente senza possibilità di rinnovamento (Fig. 16-23). Di fatto, a causa della continua degenerazione dei follicoli e degli ovociti in essi contenuti, chiamata **atresia**, le ovaie si depauperano di ovociti nel corso degli anni. Alla pubertà nelle due ovaie rimangono complessivamente circa 400.000 ovociti. Intorno ai 40-50 anni le ovaie contengono poche decine di ovociti. In conseguenza di tale depauperamento, la donna perde la fertilità, ovvero la capacità di produrre ovociti che possano essere fecondati, ed entra nella fase di vita chiamata **menopausa**. Sebbene le cause ed i meccanismi di tali processi degenerativi non siano stati ancora del tutto chiariti, si pensa che essi rientrino nei fenomeni di **morte cellulare programmata** (PCD, programmed cell death) che si verificano in numerosi organi embrionali. È probabile che la PCD degli ovociti che si verifica prima della nascita sia dovuta a diversi fattori, quali difetti nei processi meiotici e l'impossibilità delle ovaie a mantenere un elevato numero di ovociti. Per quanto riguarda l'atresia follicolare dopo la nascita, si pensa che essa normalmente inizi nelle cellule follicolari per mancanza di fattori di crescita ed ormonali e che essa colpisca successivamente l'ovocito.

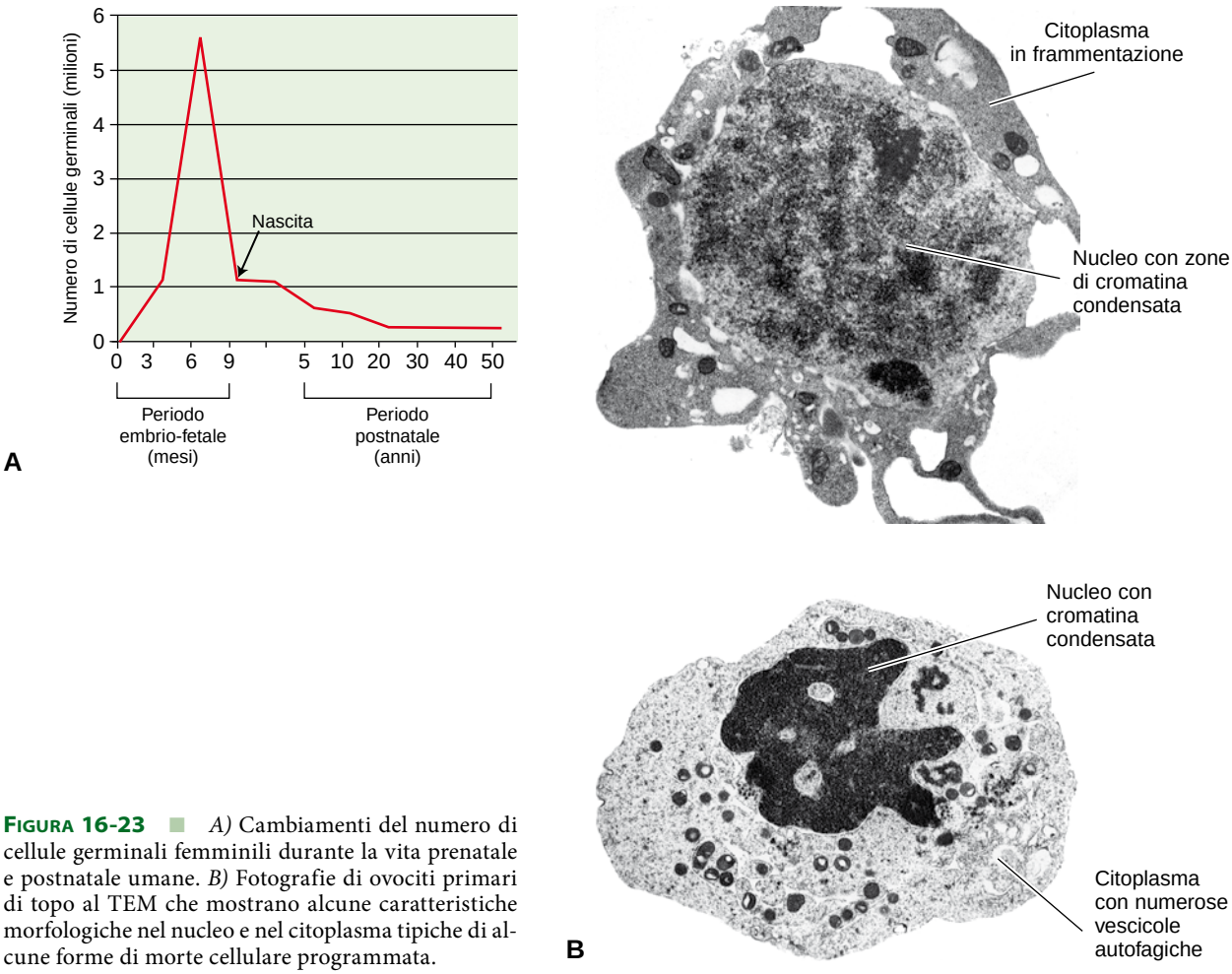



**Figura 16-23** ■ *A)* Cambiamenti del numero di cellule germinali femminili durante la vita prenatale e postnatale umane. *B)* Fotografie di ovociti primari di topo al TEM che mostrano alcune caratteristiche morfologiche nel nucleo e nel citoplasma tipiche di alcune forme di morte cellulare programmata.

## *Formazione di nuovi ovociti nelle ovaie dopo la nascita e produzione di ovociti in vitro da cellule staminali*

Recentemente alcune osservazioni e risultati sperimentali nel topo hanno riacceso una vecchia discussione sulla possibilità che nei mammiferi, come avviene in altre specie di animali, l'ovaio sia in grado di generare nuovi ovociti anche dopo la nascita e fino ad età adulta. D'altra parte, nei mammiferi a partire dagli anni '50 si è consolidato il concetto che il numero di ovociti è stabilito alla nascita a seguito della proliferazione prima delle PGC e poi degli oogoni e dell'ingresso in meiosi di questi ultimi (vedi paragrafi precedenti) e che nuovi ovociti non possono essere formati dopo questo periodo. Sulla base di nuovi risultati si è arrivati a sostenere che nel midollo osseo di una femmina adulta siano presenti cellule staminali che stimolate da segnali chimici provenienti dalle ovaie, passano nel sangue e arrivate nelle ovaie danno origine a nuovi ovociti o ne stimolano la produzione da parte di cellule staminali presenti nell'ovaio. Alcuni gruppi di ricercatori sono riusciti ad isolare dalle ovaie di topoline e donne adulte cellule con caratteristiche di staminalità che sono in grado di generare in vitro ovociti normalmente fecondabili.

Altri risultati suggeriscono che ovociti possono essere prodotti in vitro da cellule staminali embrionali di topo e umane o addirittura da cellule staminali presenti nell'epidermide di un individuo adulto. Sebbene sembri ormai accertato che cellule con numerose caratteristiche delle germinali femminili e maschili possano essere prodotte in vitro a partire da cellule staminali, la frequenza e la rilevanza di tali processi in vivo rimangono in discussione. D'altra parte rimane da accertare il grado di differenziamento e la qualità delle cellule germinali prodotte in vitro. Ciò nonostante queste ricerche aprono nuove prospettive per lo studio della gametogenesi e la produzione di cellule germinali, impensabili fino a pochi anni fa.

## *La determinazione del sesso*

Nella specie umana la determinazione del sesso viene attuata a diversi livelli e con diversi meccanismi che agiscono in modo sequenziale durante lo sviluppo embrionale, fetale e postnatale (Fig. 16-24). Il **sesso genetico** (o cro-

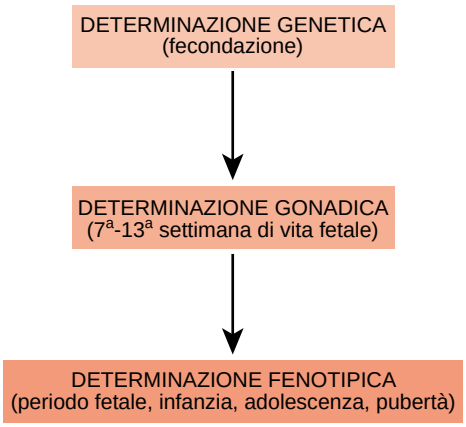



**FIGURA 16-24** ■ La determinazione del sesso.

mosomico) rappresenta il primo livello e ha luogo al momento della fecondazione quando un ovocito con il cromosoma X si fonde con uno spermatozoo che porta il cromosoma X oppure il cromosoma Y. Con un meccanismo strettamente dipendente dal sesso genetico, tra la 7ª e la 13ª settimana di vita fetale le gonadi indifferenti, inizialmente dotate di uguali potenzialità a differenziarsi in senso maschile o femminile, si differenziano in ovaie o in testicoli. Si determina così il **sesso gonadico** che rappresenta il secondo livello di determinazione del sesso e costituisce il cosiddetto carattere sessuale primario. Durante il successivo sviluppo sia prenatale che postnatale dell'individuo, la presenza di gonadi maschili o femminili a sua volta determina il differenziamento delle vie genitali e dei genitali esterni (anche questi caratteri sessuali primari) nonché la comparsa di altri caratteri, i caratteri sessuali secondari, molti dei quali si manifestano alla pubertà. Questi conferiscono alla femmina e al maschio le caratteristiche anatomiche, funzionali e comportamentali loro proprie. L'insieme dei caratteri sessuali primari (gonadi, vie genitali e organi genitali esterni) e secondari (voce, muscolatura, seni, peli, comportamento) costituiscono il **sesso fenotipico** di un individuo.

Il differenziamento sessuale delle gonadi e degli organi genitali è regolato da una complessa interazione di geni che intervengono nelle varie fasi dello sviluppo del sistema riproduttore.

### *REGOLAZIONE DELLO SVILUPPO DELLE GONADI INDIFFERENTI*

Grazie all'analisi del fenotipo di modelli animali murini (topi "knock out", vedi Capitolo 1), sono stati identificati diversi geni essenziali alla formazione e al differenziamento dell'apparato riproduttore maschile e femminile. Tuttavia, almeno per alcuni di questi geni, rimane da dimostrare l'importanza per quanto concerne la specie umana. Nel topo, è stato chiaramente dimostrato che la formazione e la crescita della gonade indifferente dipendono dall'espressione di diversi geni tra i quali ***Sf1*** (steroidogenic factor 1) e ***Wt1*** (Wilms tumor 1) giocano un ruolo chiave nei primissimi stadi di sviluppo a partire dalla cresta gonadica. Quando uno di questi geni è assente, o la sua funzione è mancante, si ottiene agenesia (assenza) delle gonadi indipendentemente dal sesso genetico dell'embrione. Entrambi i geni codificano per fattori di trascrizione che modulano l'espressione di altri specifici geni. Per esempio, SF1 partecipa anche al pro-

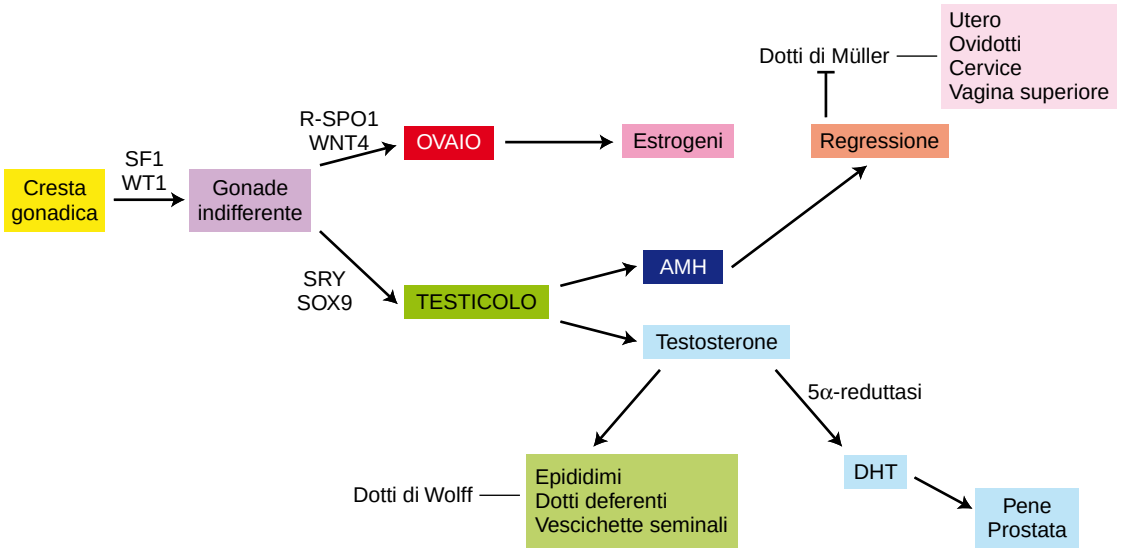



**FIGURA 16-25** ■ Regolazione molecolare del differenziamento sessuale del sistema riproduttore. I fattori di trascrizione *SF1* e *WT1* dirigono la formazione della gonade indifferente. *WNT4*, insieme a R-SPO1, ne dirige il differenziamento in ovaio; *SRY* e *SOX9* ne dirigono il differenziamento in testicolo. Il testicolo produce sia AMH (che fa regredire i dotti di Müller) che testosterone. Il T fa differenziare i dotti di Wolff nelle vie genitali ed è poi metabolizzato dalla 5α-reduttasi in DHT, che a sua volta fa differenziare la prostata e i genitali esterni.

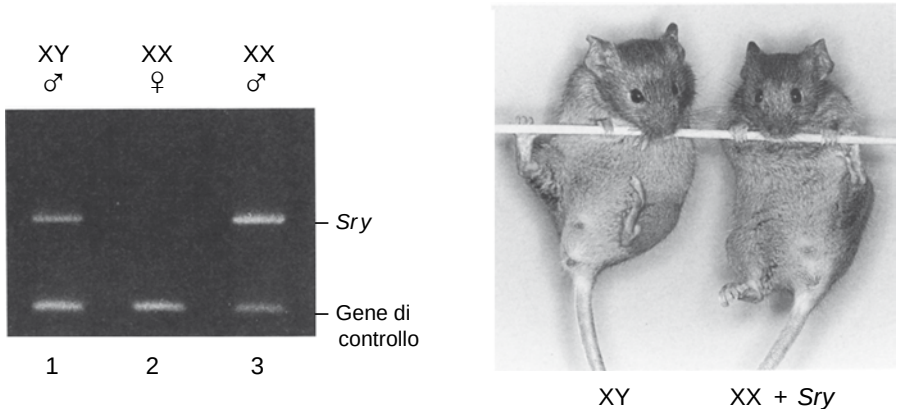



**Figura 16-26** ■ In *A)* viene mostrata un'analisi che identifica la presenza di RNA messaggeri del gene *Sry* in topi maschi o in topoline femmine in cui allo stadio di uovo fecondato è stato inserito il gene *Sry*. Notare che in topoline femmine di controllo non ci sono RNA messaggeri per questo gene. In *B)* è mostrato un topo di sesso maschile ed una topolina che pur con genotipo XX, mostra fenotipo maschile dopo l'inserimento del gene *Sry* nel suo genoma. (*Da* P. Koopman, J. Gubbay, N. Vivian, P. Goodfellow, R. Lovell-Badge, Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*, Nature, 351, 117-121, 1991, riproduzione autorizzata da Macmillan Publishers Ltd)

cesso di differenziamento del testicolo (vedi più avanti), aumentando l'espressione di ***Sox9*** (*Sry*-related high-mobility group [HMG] box-9) che coopera con il gene ***Sry*** (sex determining region of the Y) nell'induzione del sesso gonadico maschile (Figg. 16-25, 16-26 e 16-27).

### *La gonade indifferente mantiene la potenzialità di scegliere tra due diversi destini grazie a un delicato equilibrio tra segnali differenziativi: ruolo del gene Sry*

Il differenziamento della gonade indifferente in testicolo precede temporalmente il suo alternativo differenziamento in ovaio. Ciò è di particolare interesse, alla luce di quanto ora è noto sulla regolazione genetica del differenziamento gonadico. È stato infatti ben dimostrato che il differenziamento della gonade in direzione maschile avviene in conseguenza della presenza del cromosoma Y e, in particolare, dell'attivazione transitoria, nel topo di poche ore, di un gene posto sul cromosoma Y, il gene ***Sry***. Nell'uomo, una prima dimostrazione dell'importanza del cromosoma Y nella determinazione del sesso maschile, è stata fornita dall'analisi di individui portatori di aneuploidie (difetti di numero) dei cromosomi sessuali, affetti da sindrome di Turner e sindrome di Klinefelter. I primi sono genotipicamente XO (con un solo cromosoma sessuale), hanno ovaie e sono fenotipicamente femmine a causa dell'assenza dell'Y, mentre i secondi sono XXY (tre cromosomi sessuali) e hanno fenotipo sessuale maschile per la presenza dell'Y. Esperimenti di reversione del sesso su topi transgenici hanno fornito la prova definitiva che la proteina SRY è il fattore mascolinizzante che avvia il programma differenziativo del testicolo. Infatti topi con genotipo maschile XY, ma con una delezione del gene *Sry* (o inattivazione per mutazione) sviluppano un sesso gonadico e fenotipico femminile. Al contrario, quando una copia del gene *Sry* viene sperimentalmente fatta esprimere in topi con corredo cromosomico sessuale femminile (XX) il differenziamento della gonade avviene in senso maschile (Fig. 16-26). I topi XX, ma con testicoli, sono tuttavia sterili perché mancano di altri geni del cromosoma Y che sono essenziali per la spermatogenesi. È interessante notare che *Sry* è espresso in modo specifico nelle cellule somatiche della gonade indifferente XY che differenziano in cellule del Sertoli. Questo rappresenta il primo evento della cascata di attivazione genica che porta la gonade bipotente a differenziare in testicolo. Infatti l'espressione di *Sry*, in sinergia con *Sf1* (vedi paragrafo precedente), è immediatamente seguita da quella di un altro

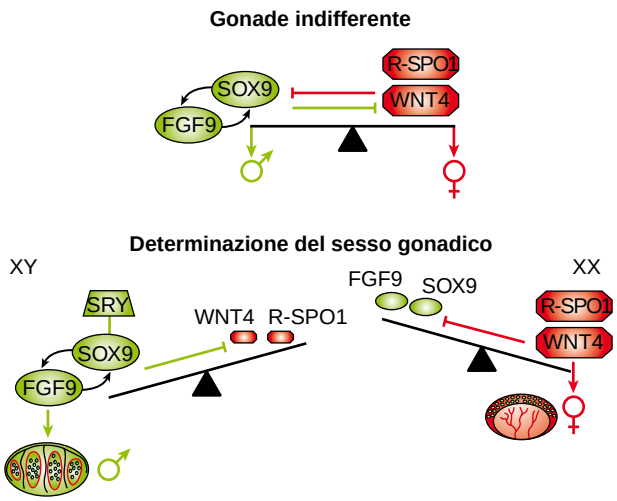



**Figura 16-27** ■ Modello molecolare del controllo del differenziamento sessuale delle gonadi nei mammiferi. La decisione di differenziare in gonade maschile o femminile si basa sul livello di espressione e repressione di fattori "maschili" come FGF9 e SOX9 o "femminili" come WNT4 e RSPO1.

gene ***Sox9***, che insieme all'azione paracrina del fattore di crescita **FGF-9** (fibroblast growth factor-9) stabilizza l'ambiente mascolinizzante consentendo lo sviluppo delle cellule del Leydig e delle cellule germinali maschili. Il ruolo cruciale di FGF-9 come segnale differenziativo maschile è ben dimostrato dal fatto che la sua assenza determina il cambiamento del destino differenziativo delle cellule del Sertoli che diventano cellule follicolari, le cellule somatiche della gonade femminile. Allo stesso tempo, in assenza di FGF-9, le cellule germinali maschili XY entrano in meiosi, comportandosi come ovociti primari.

È probabile che il differenziamento dell'ovaio non sia determinato dall'azione di un singolo gene come avviene per il testicolo. Lo sviluppo della gonade indifferente in senso femminile non è il risultato di un processo passivo, come è stato ritenuto per molti anni, ma è certamente sotto il controllo di segnali intra- ed extracellulari. Tra questi ultimi **WNT4** (wingless-related and it 4) e **R-SPO-1** (R-spondin 1) sono ritenuti i fattori di crescita primari femminilizzanti prodotti dalle cellule somatiche dell'ovaio e responsabili della regolazione del suo sviluppo, analogamente a FGF9 nel maschio. Mutazioni in questi geni causano gravi difetti nello sviluppo delle ovaie e delle vie genitali femminili sia in modelli sperimentali di topo che nell'uomo, compresa la completa inversione del sesso gonadico in individui con genotipo XX, ma con testicoli al posto delle ovaie. Sia WNT4 che R-SPO-1 agiscono attraverso specifici recettori che attivano la cosiddetta via canonica di WNT. Questa si basa sulla traslocazione di β-catenina dal citoplasma al nucleo, dove essa agisce da fattore di trascrizione attivando specifici geni (vedi Capitolo 2).

Sulla base di quanto detto sopra, è stato proposto un modello di determinazione del sesso gonadico nel quale FGF-9 e WNT4/R-SPO-1 sono i fattori di crescita extracellulari che mantengono la doppia potenzialità della gonade indifferente in un equilibrio precario tra i due destini: la prevalenza di FGF9 determina il differenziamento testicolare, quella di WNT4/R-SPO-1 quella ovarica (Fig. 16-27).

### *Differenziamento sessuale delle cellule germinali e loro ruolo nel differenziamento gonadico*

Fino all'ingresso nelle creste gonadiche le PGC non mostrano apparenti differenze tra i due sessi, ma già allo stadio di ovogoni e prospermatogoni appaiano alcune diversità. Gli ovogoni dividendosi per mitosi tendono a formare gruppi di cellule, chiamate cisti, all'interno dei quali essi comunicano tramite ponti intercellulari; gli ovogoni possiedono una capacità proliferativa probabilmente superiore a quella dei prospermatogoni. La differenza più evidente ed importante tra lo sviluppo delle cellule germinali femminili e maschili nel periodo embrio-fetale è tuttavia che gli ovogoni vanno incontro ad un cambiamento del loro ciclo cellulare da mitosi a meiosi, differenziando in ovociti primari mentre i prospermatogoni escono dal ciclo mitotico ed entrano in un G0 reversibile; la mitosi riprenderà negli spermatogoni solamente dopo la nascita con l'inizio della spermatogenesi durante la quale, come descritto nel Capitolo 6, potrà avvenire anche l'ingresso in meiosi.

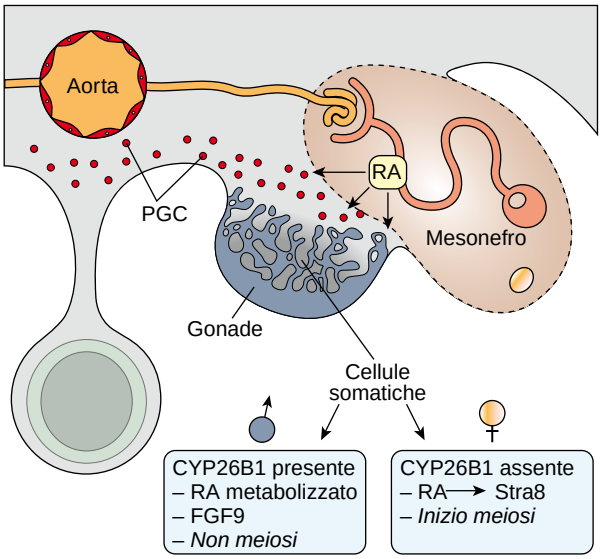



**Figura 16-28** ■ Rappresentazione schematica del ruolo dell'acido retinoico (RA) secreto dal mesonefro, ma anche dalle stesse gonadi, sull'ingresso in meiosi nelle gonadi fetali; nei testicoli l'attività dell'enzima CYP26B1 nelle cellule del Sertoli degrada RA e insieme ad altri fattori inibitori (es., FGF9) impedisce l'ingresso in meiosi delle cellule germinali.

È stato chiarito recentemente che nel topo, ma probabilmente anche nell'uomo, una precisa regolazione dei livelli di **acido retinoico** (RA, retinoic acid) è uno dei meccanismi più importanti che controlla la scelta differenziativa delle cellule germinali. Infatti è stato dimostrato che RA prodotto dal mesonefro e localmente dalle cellule somatiche dell'ovaio, stimola l'ingresso in meiosi delle cellule germinali nell'ovaio fetale e che, la sua degradazione ad opera dell'enzima CYP26B1, espresso dalle cellule del Sertoli nei testicoli, inibisce la meiosi nei prospermatogoni (Fig. 16-28). Lo stesso FGF-9, già citato in precedenza, secreto dalle Sertoli contribuisce ad inibire l'ingresso in meiosi nei prospermatogoni. Uno dei geni più importanti che viene indotto da RA negli ovociti primari e che si ritiene essenziale per le prime fasi della meiosi è ***Stra8*** (stimulated by retinoic acid gene 8); quale sia la funzione di questo gene rimane, tuttavia, ancora un mistero.

In assenza di cellule germinali il differenziamento del testicolo avviene in maniera apparentemente normale. Al contrario, nell'ovaio la presenza degli ovociti è indispensabile per la formazione dei follicoli primordiali. Due proteine, **FIGLα** (factor in the germ line α) e **NOBOX** (newborn ovary homeobox-encoding), prodotte dagli ovociti sono necessarie per la formazione dei follicoli primordiali nel topo. Si tratta di fattori di trascrizione che controllano l'espressione di diversi geni dell'ovocita, ma la loro specifica funzione nella formazione dei follicoli non è stata ancora chiarita. Sorprendentemente, gli ovociti, in concerto con gli ormoni estrogeni, sono necessari per il man-

tenimento del differenziamento delle cellule follicolari anche dopo la nascita. Difatti si è osservato che la perdita di ovociti o dei recettori per gli estrogeni in cellule della granulosa dopo la nascita può risultare nella loro trasformazione in cellule del Sertoli, ovvero nella formazione di strutture testicolari (cordoni seminiferi) all'interno dell'ovaio. In sostanza un ovaio diventa un testicolo, ovviamente non funzionale, perché non è in grado di produrre spermatozoi. Recentemente, tuttavia, il ruolo degli ovociti nel mantenimento dei follicoli dopo la nascita è stato posto in discussione. In topoline dopo la nascita è stata indotta, con un artifizio genetico, la degenerazione degli ovociti e le cellule follicolari hanno mantenuto un normale stato differenziativo. Nello stesso lavoro, gli autori dimostravano l'importanza del recettore R1 degli estrogeni (ESR1) per il mantenimento dello stato differenziato delle cellule follicolari osservando che la presenza di ESR1 e del fattore di trascrizione FOXL2 (forkhead-XL2), sono indispensabili per il mantenimento dei follicoli dopo la nascita; in loro assenza le cellule follicolari si trasformano in cellule del Sertoli e del Leydig e le ovaie in testicoli, causando la degenerazione degli ovociti.

## *Differenziamento degli organi genitali*

Il differenziamento sessuale dimorfico degli organi genitali interni ed esterni è un evento critico che ha luogo durante il primo trimestre tra l'8ª e la 13ª settimana ed è regolato dall'ambiente ormonale del feto tramite un delicato equilibrio di differenti segnali.

Lo sviluppo iniziale dei **dotti di Wolff** o mesonefrici, che si formano in entrambi i sessi, è indipendente dagli ormoni. Successivamente, mentre negli embrioni femminili i dotti degenerano, nel maschio la loro permanenza e lo sviluppo, nonché l'avvolgimento a spirale nella porzione craniale di ciascun dotto per dar luogo all'epididimo, è regolata dagli androgeni, in particolare dal **testosterone** (T) prodotto dai testicoli in formazione. Il testosterone stimola i dotti di Wolff a differenziare negli epididimi, dotti deferenti, dotti eiaculatori e vescichette seminali. Un altro ormone androgeno il **diidrotestosterone** (DHT), sempre prodotto dai testicoli, stimola lo sviluppo della prostata dal seno urogenitale e la mascolinizzazione del tubercolo genitale negli organi genitali esterni (Fig. 16-29). Il testosterone inizia ad essere prodotto dal testicolo fetale intorno all'8ª settimana e la sua concentrazione nel plasma va aumentando fino alla 12ª-14ª settimana di vita fetale. Entrambi gli androgeni svolgono la loro azione legandosi allo stesso recettore (recettore degli androgeni, AR). Tuttavia il DHT che deriva dalla conversione del testosterone ad opera dell'enzima 5-alfa reduttasi di tipo 2 specificamente nelle cellule bersaglio dell'area dei genitali esterni, è dieci volte più potente del testosterone. Gli androgeni regolano anche l'espressione di fattori di crescita che mediano le interazioni fra epitelio e mesenchima essenziali per lo sviluppo di molti organi, compresi i dotti di Wolff. I meccanismi molecolari che regolano la regressione dei dotti di Wolff nella femmina non sono stati ancora chiariti.

L'altro paio di dotti genitali, i **dotti di Müller**, che pure si formano in entrambi i sessi, va incontro a regressione nel maschio con un meccanismo apoptotico indotto dall'**ormone antimülleriano** (AMH, antimüllerian hormone) secreto dalle cellule del Sertoli intorno all'8ª settimana.

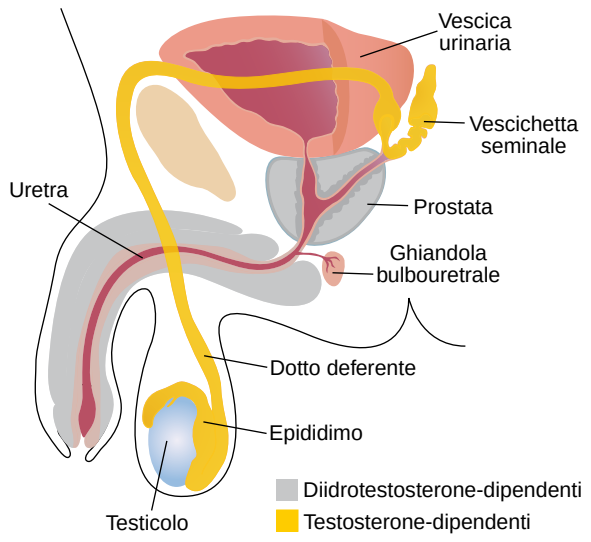



**Figura 16-29** ■ Regioni del sistema riproduttore umano che dipendono dal testosterone e dal diidrotestosterone.

## ASPETTI CLINICI

Con il termine **disordini dello sviluppo sessuale** vengono classificate quelle condizioni in cui manca una corrispondenza tra sesso genetico (genotipo) e sesso fenotipico (fenotipo sessuale) con la conseguente comparsa di ermafroditi e pseudoermafroditi, cioè di individui con genitali intermedi e spesso ambigui. Nella Tabella 16-1 è riportato il quadro completo delle patologie del sistema riproduttore dovute a difetti dello sviluppo. Alcune di queste patologie che si verificano con maggiore frequenza sono descritte più avanti.

### *Ermafroditismo vero*

L'ermafroditismo vero si ha nell'individuo in cui vi è contemporanea presenza di tessuto ovarico e testicolare. Nell'ermafroditismo vero si distinguono tre condizioni: a) un testicolo da un lato ed un ovaio dall'altro; b) presenza contemporanea di tessuto ovarico e testicolare (ovotestis) da un lato e di un ovaio dall'altro; c) ovotestis bilaterale. Solitamente la distribuzione del tessuto gonadico influenza lo sviluppo dei genitali interni e nel caso di ovotestis l'espressione fenotipica varia in funzione della prevalenza, al suo interno, di tessuto testicolare. Pertanto l'aspetto di questi soggetti può esser estremamente variabile ed ambiguo. Durante la pubertà, per esempio, può presentarsi contemporaneamente sia virilizzazione che sviluppo mammario. Va ricordato che la componente testicolare non è perfettamente funzionante, anche se talvolta può produrre piccole quantità di androgeni o di spermatozoi, ed ha un discreto rischio di degenerazione neoplastica

**TABELLA 16-1**
Patologie dello sviluppo del sistema riproduttore

| |
|---|
| ■ **Patologie del differenziamento sessuale dovute a cause genetiche o ormonali** |
| Ermafroditismo vero |
| Pseudoermafroditismo nei maschi |
| Pseudoermafroditismo nelle femmine |
| Sindrome di Turner |
| Sindrome di Klinefelter |
| ■ **Anomalie dei genitali esterni maschili** |
| Ipospadia |
| Epispadia |
| Agenesia del pene/clitoride |
| Pene/clitoride/bifido, micropene |
| Criptorchidismo/ectopia dei testicoli |
| Ernia inguinale/idrocele/cisti |
| ■ **Anomalie dei genitali esterni femminili** |
| Anomalie utero-vaginali |
| Endometrosi |
| Assenza della perforazione dell'imene |
| ■ **Tumori dalle cellule germinali** |
| Seminomi |
| Carcinomi embrionali |
| Teratomi |
| Tumori dal sacco vitellino |
| Coriocarcinomi |

(tumore del testicolo) per cui ne è solitamente consigliata l'asportazione chirurgica (orchiectomia). Il cariotipo più frequente è il 46, XX, ma si può riscontrare anche il 46, XY o un mosaicismo 46, XX/46, XY.

## *Difetti dell'azione degli androgeni e degli enzimi della via sintetica degli androgeni causano pseudoermafroditismo*

Nelle Tabella 16-2 sono riportati i principali disordini dello sviluppo sessuale causati da difetti nella sintesi o nell'azione degli ormoni androgeni. Nel considerare questi difetti bisogna ricordare che lo sviluppo delle gonadi è inizialmente ormone indipendente, mentre lo sviluppo delle vie genitali interne maschili è controllato dal testosterone e quello della prostata e dei genitali esterni dal diidrotestosterone.

La **sindrome di insensibilità agli androgeni** rappresenta la causa più comunemente identificabile di **pseudoermafroditismo maschile** (individui geneticamente maschi XY, ma con caratteristiche fenotipiche femminili di vario grado). I soggetti affetti da questa sindrome presentano un cariotipo maschile 46, XY normale, con testicoli nel canale inguinale e vie genitali interne maschili normalmente differenziate, i genitali esterni sono tuttavia completamente di tipo femminile o solo parzialmente mascolinizzati. Si tratta in sostanza di individui che appaiono fenotipicamente femmine, ma sono geneticamente maschi. Questa patologia legata al cromosoma X, è causata da una mutazione del gene del recettore degli androgeni AR con conseguente mancanza di risposta allo stimolo degli androgeni. L'insensibilità agli androgeni può essere di vari gradi, da parziale a completa, e poiché spesso il difetto si manifesta alla pubertà, con assenza di mestruazioni, si presenta il problema della decisione circa il sesso da assegnare all'adolescente.

Un difetto nella conversione da androstenedione a testosterone causa la **sindrome da deficienza dell'enzima 17-β idrossisteroido-ossidoreduttasi** (17-β HSD), un'altra forma di pseudoermafroditismo maschile. È una patologia rara autosomica recessiva in cui i pazienti presentano un cariotipo normale 46, XY, testicoli palpabili a livello inguinale o all'interno delle pieghe labio-scrotali, epididimi e dotti deferenti normali, ma genitali esterni femminili. Una parziale spiegazione di questa condizione è che l'androstenedione è capace di legare il recettore degli androgeni, pur con affinità molto bassa, ed attivare una risposta locale appena sufficiente al differenziamento dei dotti di Wolff. Un quadro patologico simile si riscontra nei pazienti 46, XY con deficienza della 5-α reduttasi (**sindrome di deficienza dell'enzima 5-α reduttasi**). L'assenza di conversione del testosterone a DHT mediata

**TABELLA 16-2**
Disordini dello sviluppo sessuale

| Possibili cause | Cariotipo | Difetti nello sviluppo dell'apparato genitale |
|---|---|---|
| Assenza di AMH/recettore di AMH | XY | Testicoli con dotti di Müller (sindrome della permanenza dei dotti di Müller). Pseudoermafroditismo maschile. |
| Assenza di 17βHSD | XY | Testicoli, epididimi e dotti deferenti. Mancata produzione di testosterone. Genitali esterni femminili. Pseudoermafroditismo maschile. |
| Assenza di 5α-reduttasi | XY | Testicoli, produzione di testosterone, mancanza di DHT. Presenza di epididimi e dotti deferenti, genitali esterni femminilizzati. Pseudoermafroditismo maschile. |
| Assenza recettore androgeni | XY | Testicoli, testosterone e DHT. Genitali interni ed esterni femminili. Pseudoermafroditismo maschile. |
| Eccesso di ACTH e testosterone | XX | Ovaie e genitali interni femminili. Genitali esterni ambigui. Pseudoermafroditismo femminile (sindrome di iperplasia surrenalica congenita) |
| Mosaicismo | XX o XY | Chimere. Presenza di ovotestis. Genitali interni ed esterni ambigui, di tipo prevalentemente maschile. Ermafroditismo vero. |

da questo enzima porta a diversi gradi di devirilizzazione/femminilizzazione dei genitali esterni. Tuttavia lo sviluppo e il differenziamento dei dotti di Wolff sono normali, perché dipendono dal testosterone che è presente in concentrazioni normali o leggermente più alte.

Una rara forma di pseudoermafroditismo maschile è rappresentata dalla **sindrome della permanenza dei dotti di Müller**, che è causata da mutazioni dell'ormone antimülleriano o del suo recettore. I pazienti maschi hanno i testicoli e genitali esterni virilizzati, ma anche residui di utero e ovidutti.

Un eccesso di androgeni è la causa di **pseudoermafroditismo femminile** (individui geneticamente femmine, 46, XX, ma con genitali esterni maschili). Gli androgeni possono provenire dalla madre durante la fase critica del differenziamento sessuale e possono provocare virilizzazione dei genitali esterni. Più spesso però, un eccesso di androgeni durante lo sviluppo fetale è causato da difetti della secrezione delle ghiandole surrenali (pseudoermafroditismo femminile da **iperplasia surrenalica congenita**). Il testosterone viene normalmente secreto, infatti, seppure in piccola quantità, anche nelle donne, dai surreni stimolati dall'ormone ipofisario ACTH (adrenocorticotropic hormone). Il cortisolo prodotto dalla corteccia del surrene con un meccanismo di feedback negativo determina un abbassamento della secrezione di ACTH, che a sua volta risulta in una diminuita secrezione di testosterone da parte del surrene. Nella sindrome da iperplasia surrenalica congenita, causata da deficienza dell'enzima CYP21 della via sintetica del cortisolo, la mancanza di cortisolo risulta in un eccesso di ACTH e di conseguenza in elevati livelli serici di testosterone surrenalico, provocando la virilizzazione dei genitali esterni in soggetti geneticamente femminili.

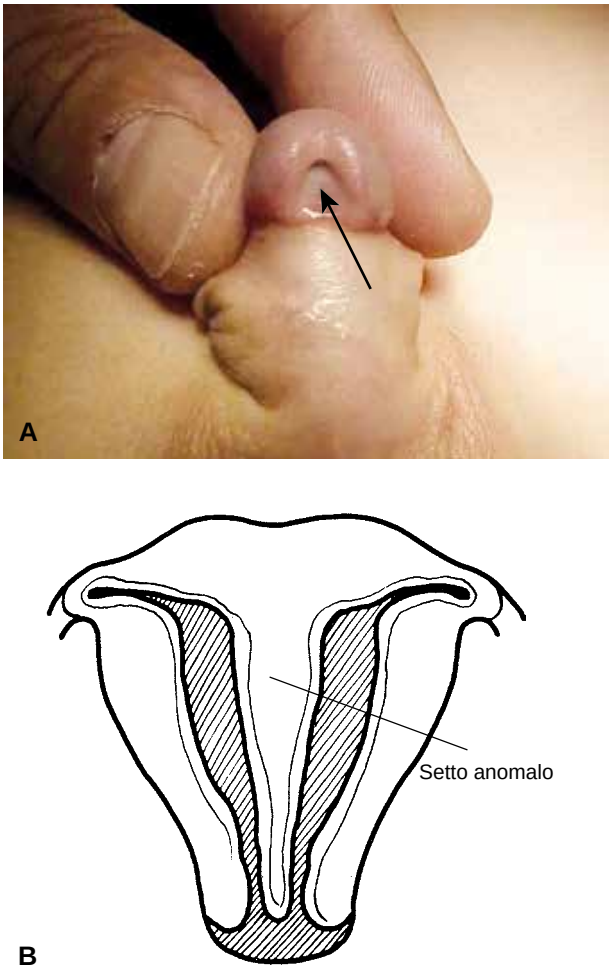



**Figura 16-30** ■ *A)* Ipospadia in cui lo sbocco dell'uretra (freccia) è nella regione media del pene. *B)* Disegno che mostra l'utero setto. (*Da* M.B. Cetroni e coll., in Ceccarelli VI.)

## Aneuploidie dei cromosomi sessuali: la sindrome di Turner e la sindrome di Klinefelter

La **sindrome di Turner** è causata dalla mancanza di un cromosoma X nelle femmine e un cariotipo 45 X o un mosaicismo 45 X/46 XX. Si manifesta nelle femmine (frequenza 1: 5000) con una mancata maturità sessuale (ipogonadismo) e una serie di malformazioni che comprendono bassa statura, coartazione dell'aorta e cisti linfatiche cervicali. La **sindrome di Klinefelter** è caratterizzata da un cromosoma X soprannumerario nei maschi e un cariotipo 47, XXY o da mosaicismo con cellule che contengono combinazioni diverse di cromosomi sessuali. Si manifesta nei maschi (1:500) con ipogonadismo, azoospermia o oligozoospermia, sviluppo delle mammelle (ginecomastia) ed estremità allungate (eunucoidismo) (vedi anche Capitolo 5). Entrambe le patologie sono dovute a mancata disgiunzione dei cromosomi sessuali durante la meiosi o nelle fasi precoci della segmentazione.

## Difetti del processo di fusione di abbozzi pari portano ad anomalie degli organi genitali

L'**ipospadia** è una delle più comuni malformazioni congenite dei genitali esterni che colpisce i maschi con una frequenza di 1:300. Si presenta in molte forme, ma prevalentemente consiste nell'anomalia dell'apertura dell'uretra che si trova sulla superficie ventrale del pene anziché sulla punta del glande (Fig. 16-30A), dovuta ad un difetto nel processo di fusione delle pieghe uretrali durante la formazione dell'uretra peniena. Le cause genetiche possono essere un'alterazione dell'espressione del recettore degli androgeni (AR) e della 5 α-reduttasi (vedi paragrafo "Processi e molecole"), oppure un difetto nella risposta ormonale mediata dall'AR.

Nelle femmine difetti nella fusione dei dotti di Müller sono la causa di malformazioni come **utero bicorne**, un utero che presenta una doppia cavità separata da una membrana interna o l'**utero setto** (Fig. 16-30B), in cui l'utero è suddiviso da un setto connettivale.

## Difetto del processo di discesa dei testicoli nello scroto

Quando i testicoli rimangono nella cavità addominale o nel canale inguinale e non raggiungono lo scroto al ter-

mine della loro discesa, si verifica una condizione nota con il nome di **criptorchidismo** (unilaterale o bilaterale, a seconda se uno o ambedue i testicoli non scendono). Si tratta della più frequente anomalia (2-4%) nei neonati di sesso maschile, considerata un fattore di rischio per l'insorgenza di infertilità e cancro testicolare nell'adulto (vedi Capitolo 6). Tra i vari fattori eziologici del criptorchidismo, giocano un ruolo critico i difetti nel meccanismo di azione del testosterone, nonché della sua sintesi e metabolismo, e le mutazioni dei geni del **fattore 3 insulino-simile** (INSL3, insulin-like factor 3), un ormone proteico prodotto dalle cellule del Leydig del testicolo, e del suo recettore.

## *Interferenti endocrini e anomalie del tratto riproduttivo*

Da analisi epidemiologiche recenti è emerso che le alterazioni dello sviluppo del sistema urogenitale del maschio, tra cui ipospadia, micropene, genitali ambigui e criptorchidismo, isolate o tra loro variamente associate, sono in continuo aumento. Sia evidenze sperimentali su modelli animali che evidenze cliniche indicano come possibile causa di tali disordini l'esposizione a fattori ambientali nocivi, quali bisfenolo A, ftalati, xenoestrogeni, fitoestrogeni, denominati **interferenti endocrini** per la loro proprietà di alterare la normale funzione del sistema endocrino. L'osservazione di una diminuzione dei livelli di testosterone prodotto dalle cellule del Leydig, associata ad alti livelli di interferenti endocrini nel latte o nelle urine materne, ha fatto avanzare l'ipotesi che l'eccessiva esposizione nel periodo fetale sia responsabile dell'insorgenza di malformazioni del tratto riproduttivo maschile nell'età postnatale.

## *Tumori che originano da cellule germinali*

I tumori che originano dalle cellule germinali sono un gruppo eterogeneo di neoplasie benigne o maligne che si localizzano nelle gonadi, sia nelle ovaie che nei testicoli,

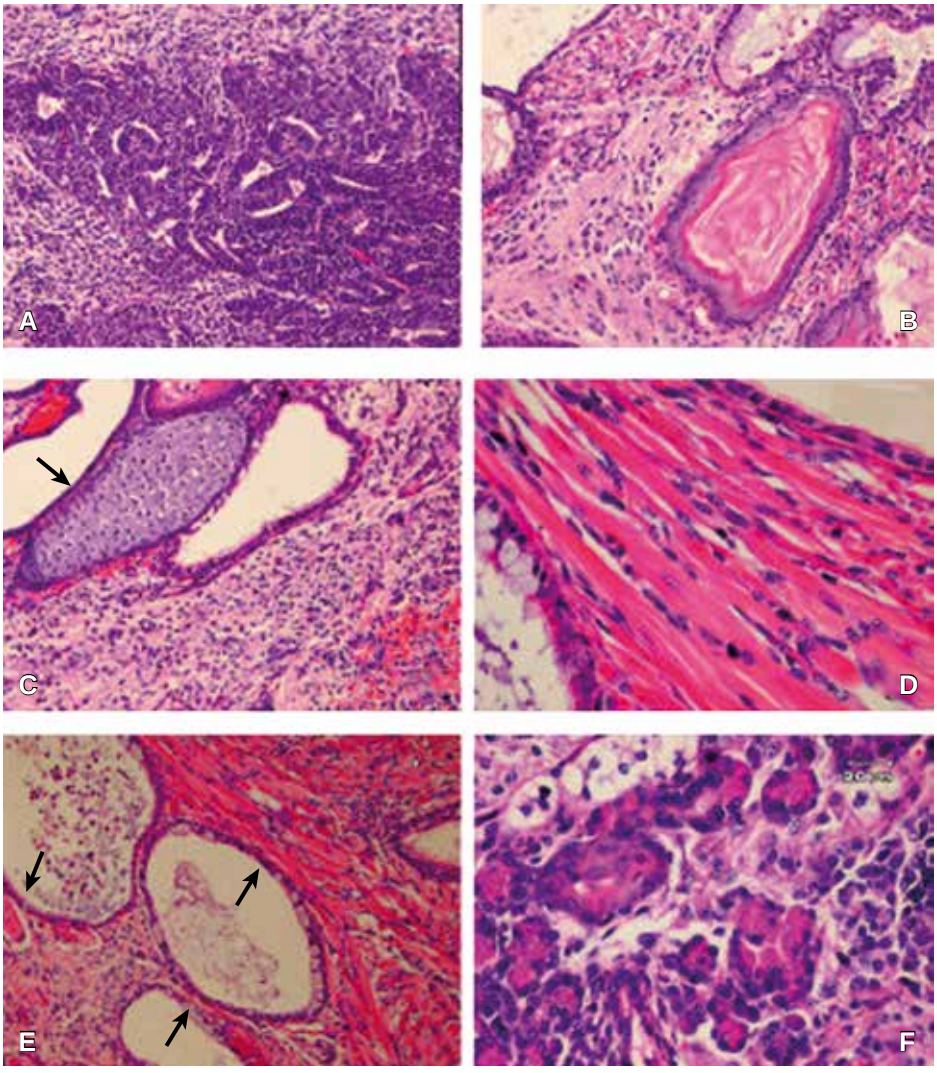



**Figura 16-31** ■ Sezioni istologiche di un teratoma testicolare nel topo in cui si possono riconoscere diversi tessuti differenziati: *A)* tessuto nervoso, *B)* tessuto epiteliale cheratinizzato, *C)* tessuto cartilagineo (freccia), *D)* tessuto muscolare striato, *E)* tessuto epiteliale (frecce), *F)* tessuto ghiandolare.

ma anche in vari siti extragonadici, quali le regioni sacrococcigea, retroperitoneale, mediastinica, epifisaria e ipotalamo-ipofisaria dell'encefalo. La distribuzione anatomica dei tumori germinali extragonadici riflette la loro probabile origine da un difetto di migrazione delle PGC durante l'embriogenesi. Indipendentemente dalla loro sede i tumori germinali sono classificati come **seminomi** (denominati germinomi nell'ipofisi e disgerminomi nelle ovaie), con cellule morfologicamente simili a cellule germinali indifferenziate dell'epitelio seminifero, e **non seminomi** (carcinomi embrionali, coriocarcinomi, tumori del sacco vitellino, teratomi), con cellule di varia morfologia. A volte i tumori germinali sono classificati misti, quando contengono tipologie cellulari di seminomi e non seminomi. L'esito del tumore e le terapie variano a seconda del tipo di tumore. I tumori germinali in siti extragonadici si sviluppano generalmente nei bambini.

Nei testicoli sia i seminomi che i non seminomi, con l'eccezione dei rari seminomi spermatocitici che si ritiene originino da spermatogoni B o da spermatociti all'inizio della meiosi (vedi Capitolo 6), derivano molto probabilmente da un comune precursore, le **cellule da carcinoma in situ (CIS)**; anche le CIS sembrano originare dalle PGC o dai gonociti da esse derivati. A seconda dell'evoluzione del differenziamento delle cellule CIS, si originano poi le diverse varietà di tumori germinali testicolari (vedi Capitolo 6).

I **teratomi** appartengono alla classe dei non seminomi che si sviluppano sia nelle gonadi che in altre sedi. Il teratoma sacrale è uno dei più frequenti (1:40000), soprattutto nei neonati di sesso femminile, e può essere rimosso chirurgicamente. L'istologia dei teratomi è molto caratteristica, in quanto in questi tumori si trovano cellule differenziate che appartengono a svariati tipi di tessuti differenziati tra cui tessuti ghiandolari, cartilaginei, tessuto nervoso, osseo e perfino denti in formazione (Fig. 16-31).

Per i tumori germinali dell'ovaio, vedi il Capitolo 7.

## FORMAZIONE DEL SISTEMA URINARIO

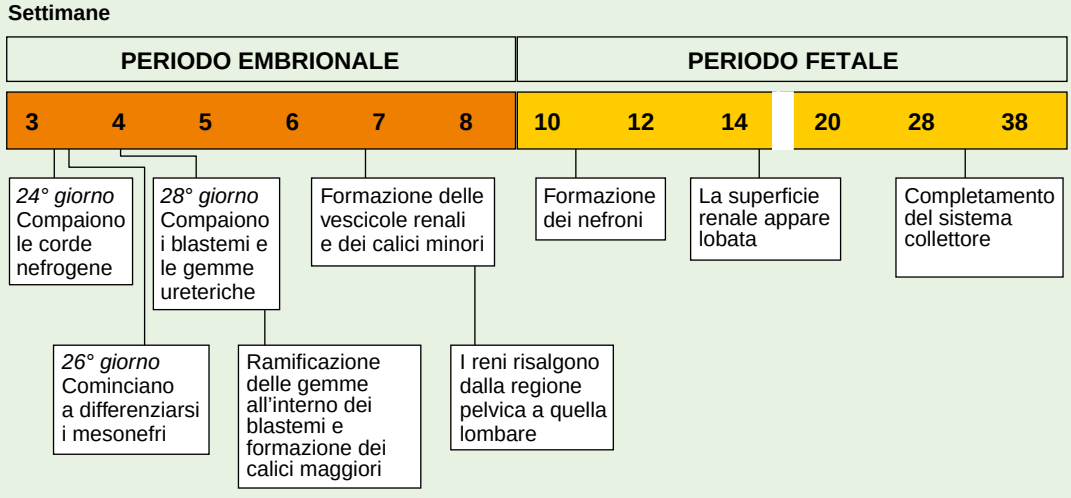
Il sistema urinario è composto dai **reni**, gli **ureteri**, la **vescica** e l'**uretra** (Fig. 16-32). I reni servono principalmente a filtrare e depurare il sangue dai prodotti di rifiuto che vengono raccolti nel prodotto di escrezione del rene, l'urina, che convogliata tramite gli ureteri nella vescica, sarà quindi liberata all'esterno mediante l'uretra. Le strutture del rene deputate alla filtrazione del sangue ed alla produzione dell'urina si chiamano **nefroni** (ogni rene ne contiene circa un milione), mentre il sistema collettore dell'urina è formato dai tubuli collettori che si aprono nei calici minori e questi nei calici maggiori (pelvi renale). Ciascun nefrone è composto dalla capsula di Bowman che avvolge il glomerulo (insieme di capillari che collegano l'arteriola afferente e quella efferente raccolti in gomitolo), il tubulo convoluto prossimale, l'ansa di Henle e il tubulo convoluto distale che si continua con il dotto collettore (Fig. 16-32).

### Sviluppo dei reni

Dal mesoderma intermedio situato da entrambi i lati della linea mediana si sviluppano due cordoni di cellule, denominati **corde nefrogene**, che decorrono lungo l'asse antero-posteriore dell'embrione e rappresentano i primordi dei reni. Durante lo sviluppo si formano tre differenti sistemi pari renali, **pronefri**, **mesonefri** e **metanefri** che si succedono uno dopo l'altro, non solo nel tempo, ma anche nello spazio, procedendo in direzione cefalocaudale (Figg. 16-33, 16-34 e 16-35). I primi due sistemi hanno entrambi una struttura metamerica simile, sono transitori, ma essenziali per la formazione del terzo sistema che rappresenta i reni definitivi, non metamerici.

All'inizio della 4ª settimana per frammentazione di ciascuna corda nefrogena nella sua regione più craniale si formano cinque-sette **nefrotomi** a cui si associa un dotto longitudinale, **dotto pronefrico**, che si allunga

### TABELLA CRONOLOGICA DELLO SVILUPPO TEMPORALE DEL SISTEMA URINARIO



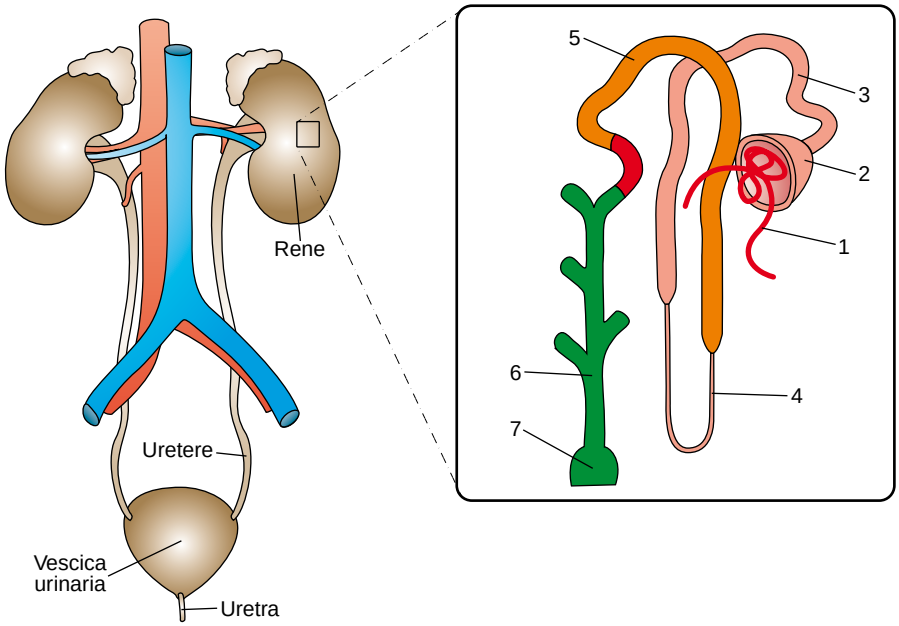



**FIGURA 16-32** ■ A sinistra schema del sistema urinario. A destra schema di un nefrone. 1) glomerulo, 2) capsula di Bowman, 3) tubulo convoluto prossimale, 4) ansa di Henle, 5) tubulo convoluto distale, 6) dotto collettore, 7) calice minore.

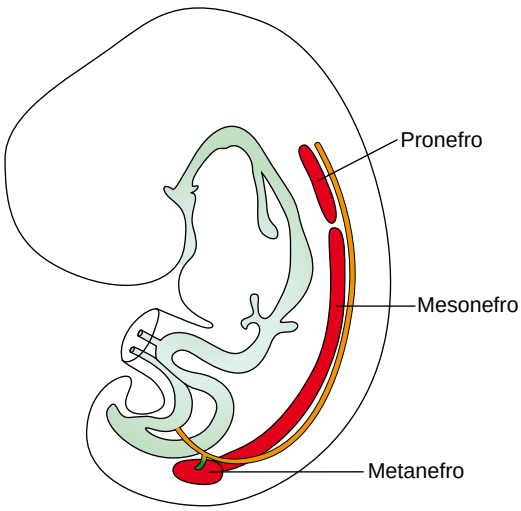



**FIGURA 16-33** ■ I tre sistemi renali derivano dal mesoderma intermedio (visione laterale dell'embrione) e si sviluppano in successione sia nel tempo che nello spazio.

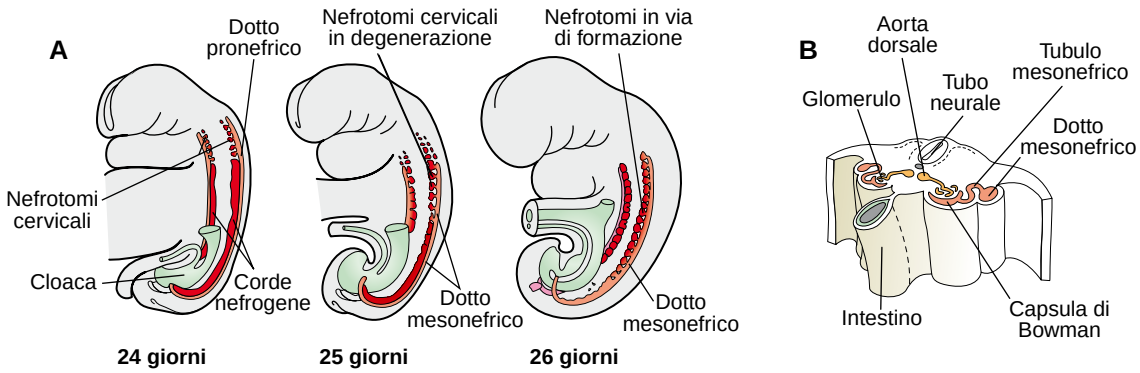



**FIGURA 16-34** ■ Formazione del mesonefro. *A)* I nefrotomi si sviluppano nella regione lombare lateralmente a ciascun dotto longitudinale (dotto mesonefrico o di Wolff). *B)* Sezione trasversale dei mesonefri.

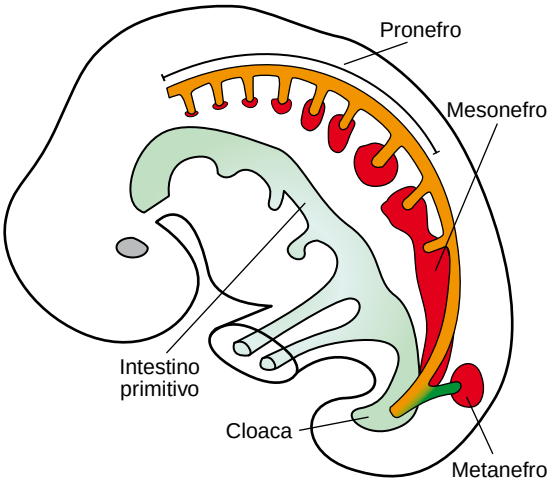



**Figura 16-35** ■ Il disegno mostra il pronefro in degenerazione, il mesonefro in formazione e l'abbozzo del metanefro (futuro rene).

caudalmente in direzione della cloaca. Mentre i nefrotomi degenerano rapidamente alla fine della 4ª settimana, ciascun dotto pronefrico dà origine al **dotto mesonefrico** (**dotto di Wolff**) che va ad aprirsi nella cloaca (Figg. 16-34 e 16-35). Il mesenchima della corda nefrogena sottostante il pronefro e adiacente al dotto di Wolff viene indotto a formare una serie di **tubuli mesonefrici**. In particolare, i segnali induttivi (vedi più avanti) da parte del dotto mesonefrico fanno sì che da ciascun nefrotomo delle corde nefrogene si forma una vescicola che allungandosi dà origine a un tubulo mesonefrico, la cui estremità dorsale si apre nel dotto di Wolff, mentre la sua estremità opposta va a circondare un gomitolo di capillari (glomerulo), derivanti dall'aorta dorsale formando la capsula di Bowman. I tubuli mesonefrici e il dotto di Wolff compongono il **mesonefro** che non ha rilevanza fisiologica come rene, ma gioca un ruolo essenziale nello sviluppo del metanefro e nella formazione di organi genitali maschili interni. Difatti come descritto nei precedenti paragrafi, i tubuli mesonefrici della regione più craniale diventeranno i condottini efferenti e i dotti di Wolff daranno origine agli epididimi, dotti deferenti, dotti eiaculatori e vescichette seminali. Nella femmina sia i tubuli mesonefrici che i dotti di Wolff degenerano, questi ultimi dopo aver dato origine alle gemme ureteriche (vedi più avanti), andando incontro ad apoptosi.

I metanefri o reni definitivi cominciano a differenziare all'inizio della 5ª settimana quando ciascuna **gemma ureterica** che si forma dalla porzione caudale del dotto di Wolff penetra nella massa di mesenchima non frammentato, denominata **blastema metanefrico**, derivante dal mesoderma intermedio delle corde nefrogene situato nella regione sacrale (Fig. 16-35). La prima porzione della gemma ureterica all'interno del blastema si allarga a formare la **pelvi renale**. In seguito la gemma ureterica si arborizza in numerose ramificazioni chiamate **dotti collettori**. I dotti collettori delle prime generazioni si fondono dando origine ai **calici maggiori** che partono dalla pelvi. Dall'estremità dei calici maggiori si formano altre generazioni di dotti che si fondono a loro volta dando origine ai **calici minori**. Successive ramificazioni portano alla formazione di un gran numero di dotti collettori (**sistema collettore**) (Fig. 16-36). L'estremità di ciascun dotto collettore viene circondata da ammassi di cellule mesenchimali del blastema metanefrico che mediante un processo di transizione mesenchima-epitelio danno luogo ai tubuli renali dei **nefroni** (tubulo convoluto distale, ansa di Henle, tubulo convoluto prossimale, capsula di Bowman). Si forma così il **sistema escretore** (Fig. 16-37) (vedi paragrafo "Processi e molecole"). Quindi nella formazione del rene definitivo il sistema escretore (nefroni) e quello collettore hanno origini diverse, in quanto il primo deriva dal blastema metanefrico e il secondo dalla gemma ureterica. Come si vedrà più avanti, lo sviluppo corretto del rene dipende dalle reciproche interazioni tra queste due componenti.

## Sviluppo degli ureteri, della vescica e dell'uretra

Gli **ureteri** sono tubicini di passaggio dell'urina dai reni alla vescica, uno per ciascun rene. Si formano dalla **gem-**

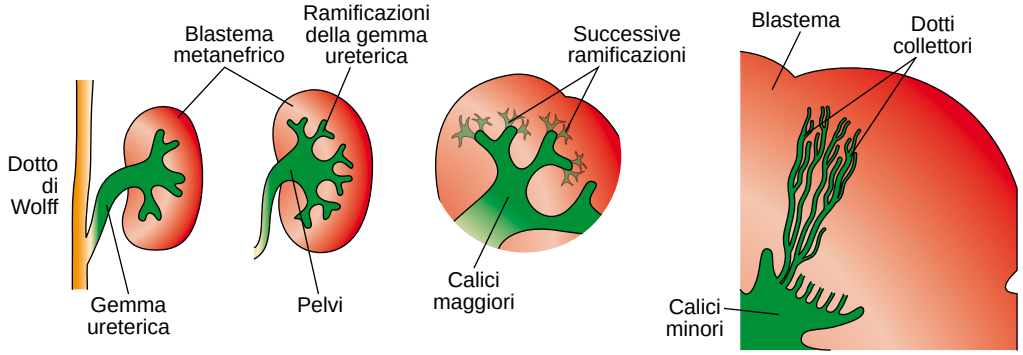



**Figura 16-36** ■ Sviluppo del metanefro. Formazione del sistema collettore (pelvi, calici maggiori, calici minori e dotti collettori) che deriva dalla gemma ureterica. Il blastema metanefrico darà origine al sistema escretore (nefroni).

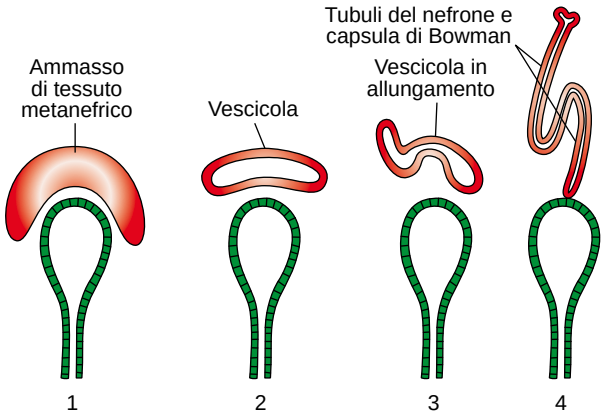



**Figura 16-37** ■ Sviluppo del nefrone. Quattro stadi iniziali in sequenza dell'interazioni tra l'estremità di un dotto collettore in formazione (in verde) e tessuto metanefrico (in rosso) durante la formazione di un nefrone.

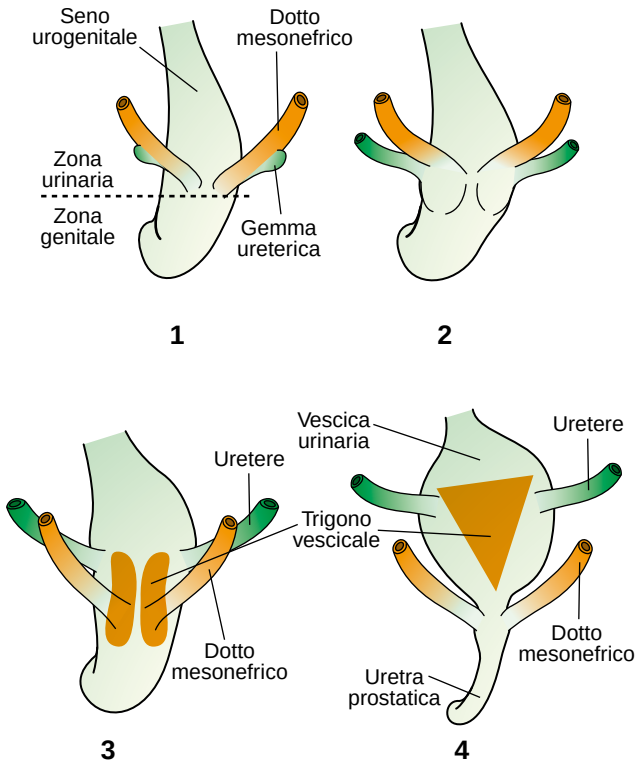



**Figura 16-38** ■ Formazione del trigono vescicale nella parete posteriore del seno urogenitale in sequenza da *(1)* a *(4)*. In questa regione sbocca inizialmente il dotto di Wolff, o dotto mesonefrico, da cui si origina la gemma ureterica. I due dotti progressivamente si separano, il dotto di Wolff finirà con lo sboccare ventralmente a livello dell'uretra in formazione, mentre la gemma ureterica trasformandosi in uretere terminerà nella vescica.

**ma ureterica** che prolifera dal dotto di Wolff e si allungano in direzione della cloaca, aprendosi inizialmente negli stessi dotti mesonefrici. Successivamente gli ureteri presenteranno uno sbocco nella parete della vescica separato da quello dei dotti mesonefrici (vedi più avanti). La **vescica** deriva dalla porzione superiore del seno urogenitale. Come descritto in un precedente capitolo il seno urogenitale è la porzione anteriore della cloaca, separata da quella posteriore che dà origine al canale anorettale, in seguito alla suddivisione da parte del setto urorettale. L'urina raccolta nella vescica fuoriesce da essa mediante l'**uretra prostatica** che deriva dalla porzione inferiore del seno urogenitale (sia la vescica che l'uretra sono quindi di origine endodermica). L'uretra prostatica si continua con la porzione peniena dell'uretra (**uretra peniena**), che origina invece, come visto in un precedente paragrafo, dalle pieghe uretrali di natura ectodermica. Quando avviene la divisione della cloaca e la formazione del seno urogenitale, sulla parete posteriore endodermica di quest'ultimo ha luogo una incorporazione di tessuto mesodermico che viene chiamata **trigono vescicale**. Questo si forma in seguito all'allargamento della porzione caudale dei dotti di Wolff al livello della loro apertura nella parete della vescica. Di conseguenza, gli orifici degli ureteri che inizialmente si aprivano nei dotti di Wolff, si aprono più cranialmente e direttamente nella parete posteriore della vescica, separatamente da quelli dei dotti di Wolff (che nel maschio diventeranno i dotti eiaculatori) che si aprono più in basso nell'uretra (Fig. 16-38). Durante lo sviluppo, l'epitelio mesodermico del trigono viene in seguito sostituito dall'epitelio dell'endoderma circostante.

## Ascesa dei reni

L'abbozzo dei reni si trova in origine nella regione delle pelvi al lato dorso mediale dell'estremità caudale del mesonefro. Essi si spostano gradatamente verso la parete posteriore della cavità addominale e conseguentemente gli ureteri si allungano. Al termine del 2° mese i reni si trovano a livello delle prime quattro vertebre lombari al di sotto delle ghiandole surrenali. Mentre ascende il rene ruota medialmente quasi di 90° in modo tale che l'ilo da ventrale diviene antero-mediale.

## Formazione delle ghiandole surrenali

Le ghiandole surrenali (o surreni) sono organi pari posizionati sulla sommità di ciascun rene. Il loro sviluppo è strettamente associato a quello del sistema urogenitale. L'abbozzo della porzione corticale del surrene origina dall'epitelio celomatico (splancnopleura) situato tra la cresta gonadica e il mesentere dorsale, mentre la porzione midollare è formata da cellule delle creste neurali (vedi Capitolo 13).

## PROCESSI E MOLECOLE

Lo sviluppo dei reni rappresenta un sistema molto utile per lo studio di alcuni temi fondamentali nell'ambito

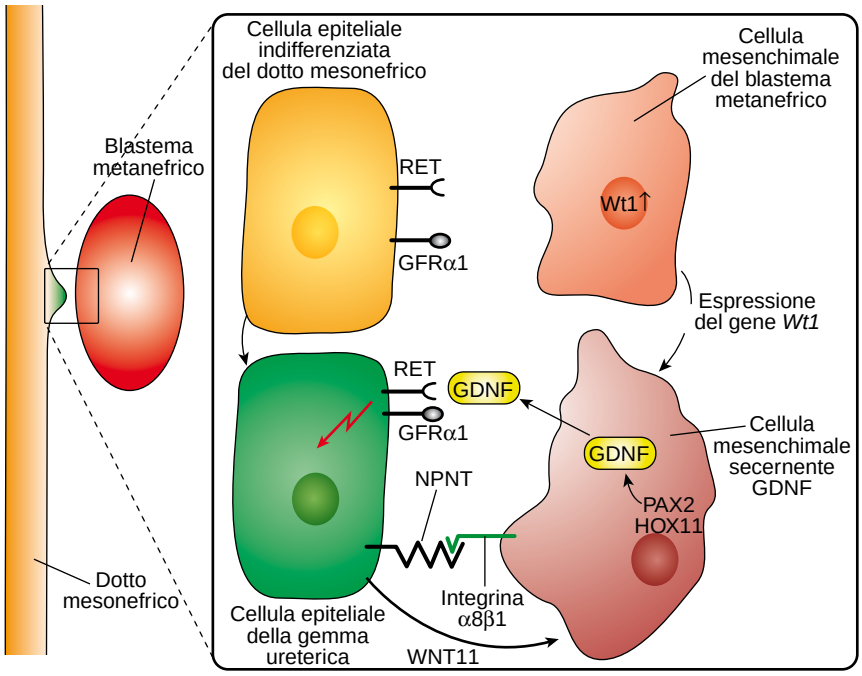



**Figura 16-39** ■ Schema dei processi molecolari coinvolti nello sviluppo della gemma ureterica dipendente dall'induzione da parte delle cellule mesenchimali del blastema metanefrico. Vedi il testo per i dettagli.

della biologia dello sviluppo, quali i processi induttivi che regolano le interazioni tra tessuti, la transizione epitelio-mesenchima e il suo inverso, e il processo di arborizzazione di tubuli epiteliali. Come già accennato, lo sviluppo del rene definitivo richiede una complessa interazione reciproca tra la componente epiteliale, il dotto di Wolff, e quella mesenchimale, il blastema metanefrico (Figg. 16-39 e 16-40).

## *Il blastema metanefrico secerne GDNF che induce lo sviluppo della gemma ureterica*

L'evento iniziale per la formazione dei reni definitivi è la formazione della gemma ureterica da ciascun dotto di Wolff. Questo evento cruciale dipende dal fattore di crescita **GDNF** (glial derived neurotrophic factor) che viene rilasciato dal blastema metanefrico e induce le cellule epiteliali del dotto di Wolff, esprimenti il complesso recettoriale per GDNF, chiamato **RET-GFRα1** (receptor

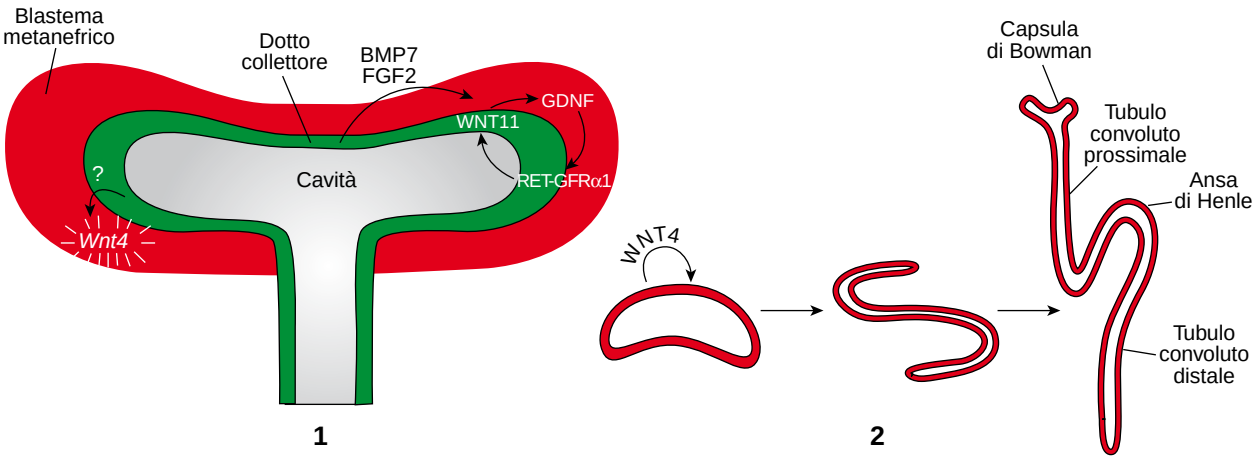



**Figura 16-40** ■ Schema dei processi molecolari coinvolti nello sviluppo del nefrone. *1)* Cellule epiteliali del dotto collettore (in verde) inducono l'espressione del gene *Wnt4* nelle cellule mesenchimali (in rosso) del blastema metanefrico. Il fattore di crescita WNT11, seguito da BMP7 e FGF2, secreti dal dotto collettore stimolano la produzione di GDNF dal blastema metanefrico per indurre, mediante il complesso recettoriale RET-GFRα1, la ramificazione del sistema dei dotti collettori. *2)* Processo della tubulogenesi. Il gene *Wnt4* codifica per il fattore di crescita che viene secreto dalle cellule mesenchimali e con meccanismo autocrino stimola le stesse cellule a differenziare nei tubuli dei nefroni.

tyrosine kinase-GDNF-family receptor α1), a proliferare formando la gemma ureterica e successivamente a dare origine ai dotti collettori e alla loro successiva arborizzazione. Le cellule mesenchimali del blastema metanefrico acquisiscono la competenza a sintetizzare e secernere GDNF in seguito all'attivazione dell'espressione del gene ***Wt1*** (Wilms tumor 1). L'espressione del gene *Gdnf* è finemente regolata da diversi altri fattori. Tra questi vanno ricordati i fattori di trascrizione PAX2 (pair boxed 2) e HOX11 (homeobox 11) e alcuni segnali extracellulari. Questi ultimi sono rappresentati dal fattore di crescita WNT11, che viene prodotto e secreto dalle cellule epiteliali della gemma ureterica e dalle sue ramificazioni e induce il mesenchima del blastema a rilasciare GDNF con un meccanismo di feedback positivo continuo. Le interazioni epitelio-mesenchima sono infine modulate anche da una serie di molecole adesive. Tra queste la meglio caratterizzata è quella tra il recettore integrinico α8 β1 espresso dalle cellule mesenchimali e la Nefronectina (NPNT), una proteina della matrice extracellulare espressa dalle cellule epiteliali (Fig. 16-39).

### *La gemma ureterica induce il blastema metanefrico a differenziare in nefroni*

Se il mesenchima del blastema metanefrico induce la formazione della gemma ureterica e, quindi, del sistema collettore che da questa deriva, le cellule epiteliali che si organizzano nelle strutture del sistema collettore inducono a loro volta il differenziamento dei tubuli renali e dei nefroni (**nefrogenesi**) nel blastema indifferenziato. In una fase iniziale dopo WNT11, la gemma ureterica secerne i fattori di crescita BMP7 (bone morphogenetic protein 7) e FGF2 (fibroblast growth factor 2). Questi oltre a sostenere la produzione di WT1 (vedi sopra), esercitano una serie di azioni sulle cellule mesenchimali quali l'inibizione dell'apoptosi e la loro condensazione. Successivamente, fattori non ancora identificati, secreti dalle cellule epiteliali situate all'estremità di ciascun dotto collettore, inducono l'espressione del gene *Wnt4* nelle cellule mesenchimali adiacenti. La conseguente produzione di WNT4 causa con un meccanismo autocrino la **transizione mesenchima-epiteliale** alla base della formazione dei tubuli dei nefroni (Fig. 16-40). Il processo iniziale della formazione dei tubuli dei nefroni chiamato **tubulogenesi** è la formazione di una vescicola che poi si allunga a formare un tubulo a S che infine dà luogo ai diversi segmenti del neufrone (capsula di Bowman, tubulo convoluto prossimale, ansa di Henle, tubulo convoluto distale) (Fig. 16-40). Il successivo sviluppo dei nefroni e delle altre strutture del rene dipende dall'espressione di numerosi altri geni che, per non tediare oltre i nostri studenti, preferiamo non menzionare qui.

## ASPETTI CLINICI

### *Maturazione funzionale del sistema urinario*

Mentre nell'embrione umano il pronefro non diventa mai funzionale, il mesonefro probabilmente produce una piccola quantità di urina tra il 3° ed il 4°mese. Il metanefro assume gradualmente la funzione del mesonefro e lo sostituisce del tutto a partire dal 4° mese. La produzione di urina comincia intorno al 3° mese ed aumenta gradualmente. Il feto maturo può produrre fino a 450 ml di urina al giorno che viene riversata nel liquido amniotico e quindi bevuta insieme a questo dal feto. Da notare che il rene fetale a partire dal 5° mese ha una tipica forma lobata dovuta alle aree di sviluppo del sistema dei dotti collettori. I lobi rimangono visibili nei reni del neonato e di solito scompaiono dopo l'infanzia. Si ritiene che, sebbene la formazione dei nefroni sia completa prima della nascita, i reni acquisiscano piena funzionalità gradualmente solo dopo la nascita.

### *Agenesia renale, ureteri multipli e rene soprannumerario*

Circa il 20-30% di tutte le anomalie congenite che si verificano durante lo sviluppo prenatale è a carico dei reni e del sistema urinario ed è dovuto a difetti che insorgono durante fasi specifiche dello sviluppo di tale apparato.

Una malformazione che si verifica con una frequenza di 1:5000 neonati è l'**agenesia renale monolaterale** che è caratterizzata dall'assenza di un rene. Tale condizione congenita non è letale perché l'altro rene si ipertrofizza e compensa. L'**agenesia renale bilaterale** (con frequenza 1:30000) è associata invece a mortalità durante il periodo fetale o nei primi giorni dopo la nascita. Anche se le cause non sono ancora completamente conosciute, è molto probabile che tali agenesie siano dovute ad un difetto del processo di induzione della gemma ureterica da

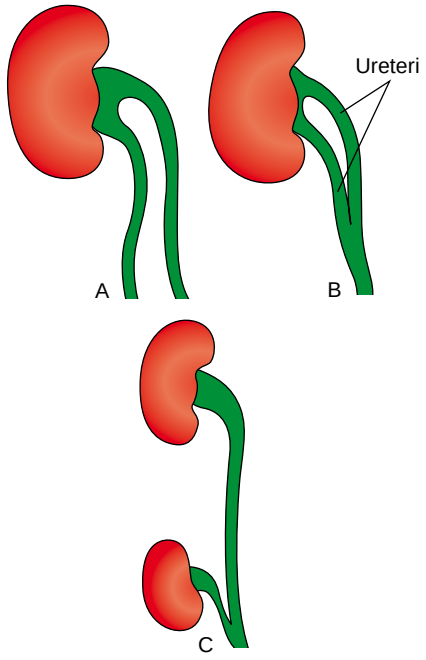



**Figura 16-41** ■ Malformazioni renali con sviluppo di ureteri multipli o rene soprannumerario.

parte del blastema metanefrico regolato, come abbiamo visto, da GDNF e il suo recettore RET. Infatti, esperimenti su topi hanno dimostrato che l'ablazione (knockout) dei geni *Gdnf* o *Ret*, causa in entrambi i casi agenesia renale.

Un eccesso o un difetto dell'espressione spaziale e temporale di GDNF sono associati alla condizione caratterizzata da **ureteri multipli** o **uretere ectopico** (Fig. 16-41A,B). Durante lo sviluppo, la gemma ureterica può andare incontro precocemente a divisione e dar luogo alla formazione di due ureteri separati o parzialmente fusi. Più raramente la divisione della gemma ureterica si accompagna anche alla divisione del blastema metanefrico dando origine alla condizione del **rene soprannumerario** (Fig. 16-41C). Anormalità della massa renale hanno origine da anomalie del numero di nefroni presenti nel rene. Poiché il numero di nefroni è strettamente associato al numero di ramificazioni della gemma ureterica, una inadeguata ramificazione dell'albero collettore è tra le ipotesi eziopatogenetiche della condizione nota come **rene ipoplastico**.

## Rene a ferro di cavallo

Il **rene a ferro di cavallo** è la più comune anomalia di fusione tra i reni (frequenza di 1:1000 neonati). Il parenchima renale su ogni lato della colonna vertebrale è unito al controlaterale in corrispondenza dei poli (di solito inferiori), attraverso un istmo di tessuto renale o fibroso localizzato sulla linea mediana. Gli ureteri decorrono medialmente e anteriormente sopra questo istmo e, in genere, drenano bene. Una causa probabile di tale malformazione è un difetto nella capsula connettivale che normalmente avvolge ciascun rene (Fig. 16-42).

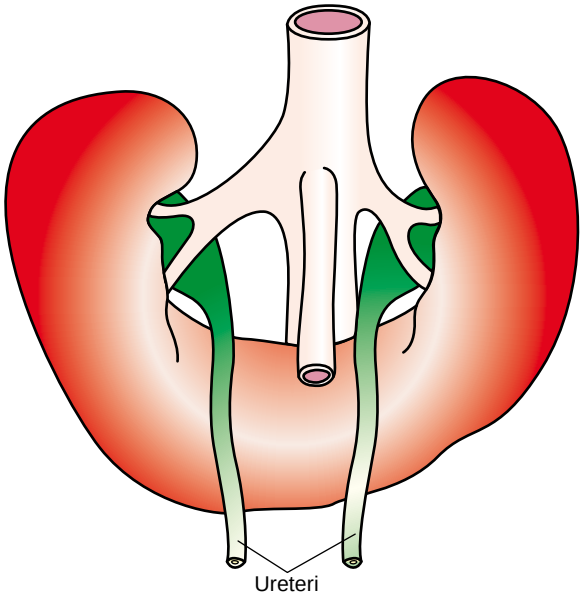



**Figura 16-42** ■ Rene a ferro di cavallo.

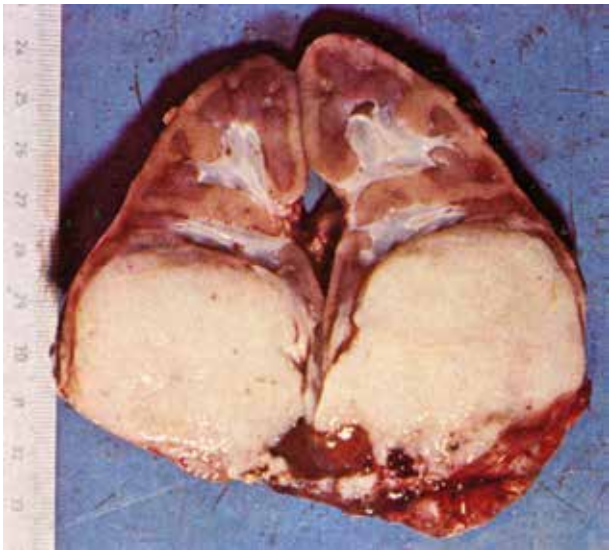


**Figura 16-43** ■ Rene colpito dal tumore di Wilms (*da* M. Raso, Anatomia patologica clinica, vol. II, Piccin Nuova Libraria, Padova, 1981).

## Il tumore di Wilms

Il **tumore di Wilms** (WT, Wilms tumor) (Fig. 16-43) è la neoplasia renale più comune nei bambini (frequenza 1:10000). Fortunatamente oggi le possibilità di cura sono molto migliorate, ottenendo sopravvivenze dell'80-90%. Il tumore di Wilms mostra una stretta associazione con alcune malformazioni congenite, in particolare con l'aniridia (assenza dell'iride negli occhi), l'emipertrofia (aumento della metà del corpo rispetto all'altro) e alcune malformazioni dei genitali, specie nei maschi (criptorchidismo, ipospadia, pseudoermafroditismo, disgenesia – alterato differenziamento – dei testicoli). Sono stati inoltre riportati casi di associazione tra il tumore e la trisomia 18. Da segnalare anche l'associazione con la neurofibromatosi (una patologia caratterizzata dalla presenza di numerosi tumori benigni fibrosi (fibromi) della pelle e del tessuto nervoso) e con la sindrome di Beckwith-Wiedemann (una sindrome causata da difetti dell'imprinting di alcuni geni che risiedono sul braccio corto del cromosoma 11).

Il tumore di Wilms è caratterizzato dalla presenza nella massa renale di residui nefrogenici che derivano da un mancato differenziamento delle cellule del blastema metanefrico in nefroni. Nel 20% dei tumori è stato trovato mutato il gene *Wt1* (da cui il nome dato al gene) che codifica per un fattore di trascrizione della famiglia cosiddetta "a dito di zinco". È un gene multifunzionale perché controlla, come abbiamo visto in un precedente paragrafo, molteplici processi differenziativi durante lo sviluppo del rene. Recentemente sono state identificate mutazioni anche in un altro gene chiamato *Wtx* presenti nel 30% dei tumori di Wilms che non presentano mutazioni di *Wt1*. *Wtx* codifica per una proteina coinvolta nella via di segnalazione dei fattori WNT coinvolti nella formazione dei tubuli renali (Fig. 16-44).

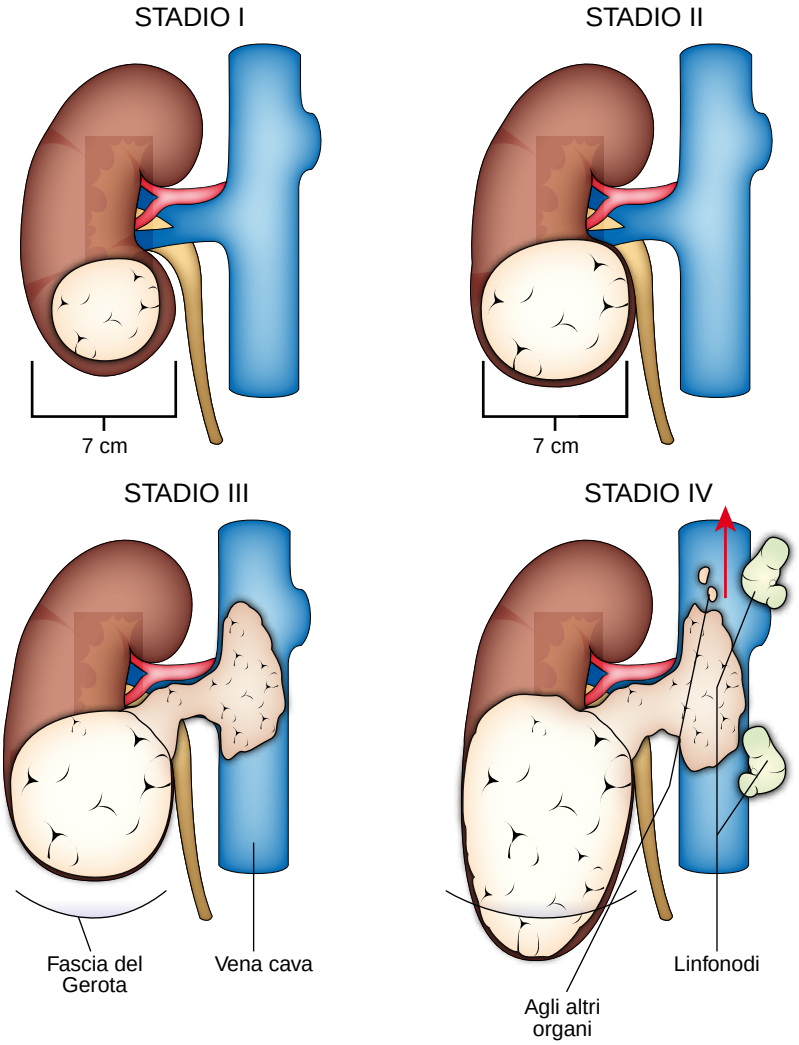



**FIGURA 16-44** ■ Stadi della formazione del tumore di Wilms.

## *Malattia policistica renale autosomica recessiva*

Sebbene rara (1/10000 nati), la **malattia policistica renale** autosomica recessiva è la più comune malattia cistica renale dell'infanzia geneticamente determinata (coinvolge entrambi i reni e il fegato) e spesso causa insufficienza renale in età infantile. Sono state individuate tre mutazioni autosomiche dominanti che causano questa malattia nei geni chiamati *Pkd1* (pyruvate dehydrogenase kinase 1), *2* e *3*. Questi geni codificano per proteine chiamate policistine coinvolte nei processi di adesione cellula-cellula e cellula-matrice. La malattia diviene sintomatica in età infantile, i sintomi sono principalmente renali, mentre le forme a esordio adolescenziale si presentano principalmente con sintomi epatici. Queste differenze probabilmente riflettono una variante fenotipica dello stesso disordine genetico. I neonati gravemente compromessi presentano di solito un'ipoplasia polmonare secondaria agli effetti intrauterini della disfunzio-

**TABELLA 16-3**
Patologie dello sviluppo del sistema urinario

| |
|---|
| ■ **Disordini del numero dei reni** |
| Agenesia renale |
| Reni sopranumerari |
| ■ **Disordine nell'ascesa dei reni/Reni ectopici** |
| ■ **Disordini nella rotazione dei reni** |
| ■ **Reni con dimensioni anormali** |
| Ipoplasia |
| Aplasia |
| ■ **Anomalie strutturali** |
| Cisti renali semplici |
| Rene policistico |
| ■ Disordini del numero degli ureteri |
| ■ Anomalie di vascolarizzazione |
| ■ Anomalie congenite dell'uretra |
| ■ Estrofia della vescica |

ne renale, associata a oligoidramnios, mentre quelli meno gravemente compromessi hanno un addome voluminoso con reni simmetrici enormi, solidi, a superficie liscia. Molti neonati muoiono nei primi giorni o nelle prime settimane di vita per insufficienza polmonare, mentre i bambini che sopravvivono presentano insufficienza renale progressiva durante i primi anni di vita.

Nella Tabella 16-3 è riportato il quadro completo delle patologie del sistema urinario dovute a difetti dello sviluppo, alcune di queste patologie che si verificano con maggiore frequenza sono descritte nel testo.

## Letture consigliate

### Sviluppo del sistema riproduttore


Bowles J, Koopman P. Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. Development 134, 3411-3420, 2007.

Brennan J, Capel B. One tissue, two fates: molecular events that underlie testis versus ovary development. Nat Rev Genet 5, 509-521, 2004.

Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decrasing quality of semen during past 50 years. BMJ 305, 609-613, 1992.

Chassot AA, Gregoire EP, Magliano M, Lavery R, Chaboissier MC. Genetics of ovarian differentiation: *Rspo1*, a major player. Sex Dev 2, 219-227, 2008.

Cool J, Capel B. Mixed signals: development of the testis. Semin Reprod Med 27, 5-13, 2009.

De Felici M. Twenty years of researches on primordial germ cells. Int J Dev Biol 45, 519-522, 2001.

De Felici M. e coll. Establishment of the oocyte population in the fetal ovary: primordial germ cell proliferation and oocyte programmed cell death. Reproduction BioMedicine On line 10, 182-191, 2005.

Hajkova P, Erhardt S, Lane N, Haaf T, El-Maarri O, Reik W, Walter J, Surani A. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. Mech Dev 117, 1-20, 2002.

Jeays-Ward K, Hoyle C, Brennan J, Dandonneau M, Alldus G, Capel B, Swain A. Endothelial and steroidigenic cell migration are regulated by Wnt4 in the developing gonad. Development 130, 3266-3670, 2003.

Jordan BK, Shen JH, Olaso R, Ingraham HA, Vilain E. Wnt4 overexpreession disrupt normal testicular vasculature and inhibits tesstosterone synthesis by repressing steroidogenic factor 1/beta-catenin synertgy. Proc Natl Acad Sci USA 100, 10866-10871, 2003.

Kobayashi A, Behringer RR. Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. Nature Reviews Genetics 4, 969-998, 2003.

McLaren A. Germ cells and soma: a new look at an old problem. New Haven, Yale University Press, 1981.

Merchant-Larios H, Moreno-Mendoza N. Onset of sex differentiation: a dialog between genes and sex. Arch Med Res 32, 553-558, 2001.

Parker KL e coll. Gene interactions in gonadal development. Annu Rev Physiol 61, 417-433, 1999.

Pesce M, Klinger FG, De Felici M. Derivation in culture of primordial germ cells from the mouse epiblast: phenotipic induction and growth control by Bmp4 signalling. Mech Dev 112, 15-24, 2002.

Uhlenhaut NH, Jakob S, Anlag K, Eisenberger T, Sekido R, Kress J, Treier A-C, Klugmann C, Klasen C, Holter NI, Riethmacher D, Schütz G, Cooney AJ, Lovell-Badge R, Treier M. Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. Cell 139, 1130-1142, 2009.

Yao HH-C, DiNapoli L, Capel B. Meiotic germ cells antagonize mesonephric cell migration and testis cord formation in mouse gonads. Development 130, 5895-5902, 2003.


### Sviluppo del sistema urinario


Davies JA, Fisher CE. Genes and proteins in renal development. Exp Nephrol 10, 102-113, 2002.

Gallagher AR, Hidaka S, Gretz N, Witzgall R. Molecular basis of autosomal-dominant polycystic kidney disease. Cell Mol Life Sci 59, 682-693, 2002.

Hinrichsen KV. Human Embryologie. Springer Verlag, 1993.

Kispert A, Vainio S, McMahon AP. Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. Development 125, 4225-4334, 1998.

Kuure S, Vuolteenaho R, Vainio S. Kidney morphogenesis: cellular and molecular regulation. Mech Dev 92, 31-45, 2000.

Miyazaki Y, Oshima K, Fogo A, Hogan BL, Ichikawa I. Bone morphogenetic protein 4 regulates the budding site and elongation of the mouse ureter. J Clin Invest 105, 863-873, 2000.

Moore MW, Klein RD, Farinas I, Sauer H, Armanini M, Phillips H, Reichardt LF, Ryan AM, Carver-Moore K, Rosenthal A. Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. Nature 4, 76-79, 1996.

Pohl M, Bhatnagar V, Mendoza SA, Nigam SK. Toward an etiological classification of developmental disorders of the kidney and upper urinary tract. Kidney Int 61, 10-9, 2002.

Pohl M, Stuart RO, Sakurai H, Nigam SK. Branching morphogenesis during kidney development. Annu Rev Physiol 62, 595-620, 2000.

Torres M, Gomez-Pardo E, Dressler GR, Gruss P. Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. Development 121, 4057-4065, 1995.

Vainio S, Lin Y. Coordinating early kidney development: lessons from gene targeting. Nature Reviews Genetics 3, 5333-5543, 2002.

Vize PD, Seufert DW, Carroll TJ, Wallingford JB. Model systems for the study of kidney development: use of the pronephros in the analysis of organ induction and patterning. Dev Biol 15, 188 (2), 189-204, 1997.

Woolf AS. A molecular and genetic view of human renal and urinary tract malformations. Kidney Int 58, 500-512, 2000.

17

# Lo sviluppo dell'apparato circolatorio

Massimo De Felici e Marina Bouché

## CENNI DI ANATOMIA ED ISTOLOGIA DEL CUORE E DEI VASI SANGUIGNI

### Anatomia ed istologia del cuore

Il cuore ha la forma di un tronco di cono schiacciato, simile ad una piramide rovesciata, alta circa 12 cm e larga circa 10 cm, compresso dall'avanti all'indietro, con tre facce, una postero-inferiore (o diaframmatica), una anteriore (o sternocostale), una laterale (o polmonare) e tre margini nel punto di incontro delle suddette facce. Inoltre, la superficie esterna del cuore è segnata da due solchi: il **solco coronario**, che taglia l'organo in senso trasversale fra il terzo superiore e i due terzi inferiori, e il **solco interatriale** (o longitudinale), che divide il cuore nella parte destra e sinistra. Il volume del cuore corrisponde approssimativamente al pugno chiuso della per-

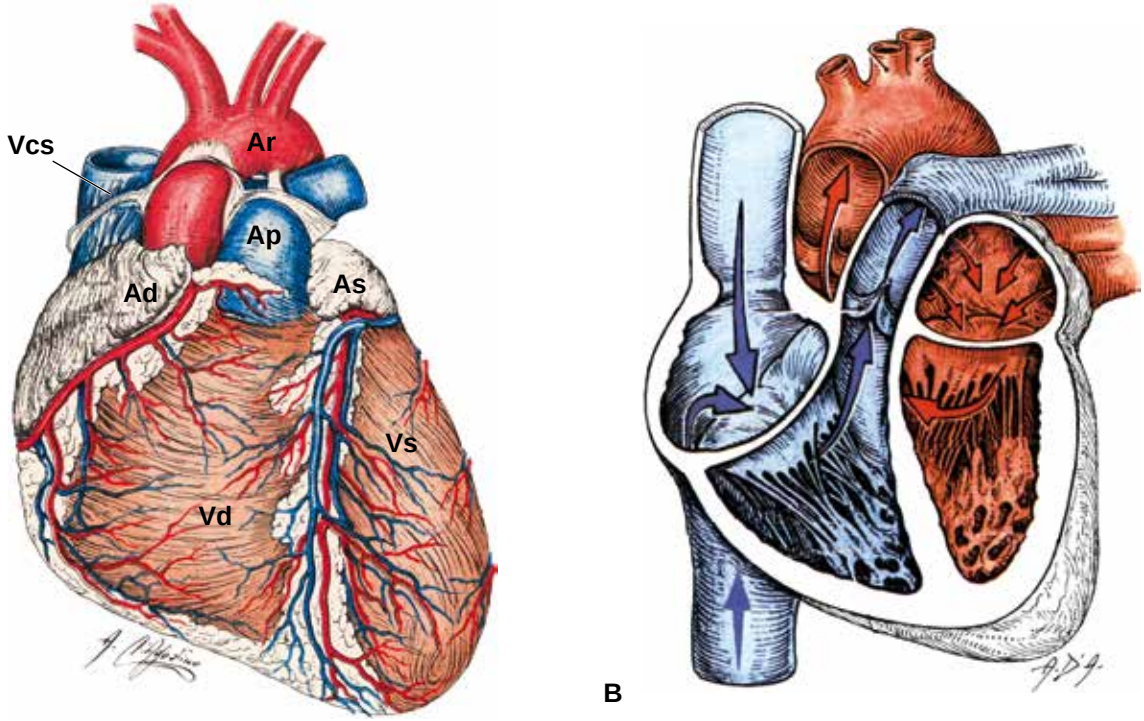



**Figura 17-1** *A)* Visione sinistra del cuore (*da* G. Lambertini, Manuale di anatomia dell'uomo, vol. I, Piccin Nuova Libraria, Padova, 1972). *B)* Schema della circolazione del sangue venoso (blu) ed arterioso (rosso) nelle quattro camere del cuore (*da* V. Mezzogiorno, A. Mezzogiorno, Compendio di anatomia umana, Piccin Nuova Libraria, Padova, 1994). Ad = atrio destro; As = atrio sinistro; Vd = ventricolo destro; Vs = ventricolo sinistro; Ar = Arco aortico; Ap = arteria polmonare; Vcs = vena cava superiore.

sona; nell'adulto maschio pesa 200-350 g, nella femmina 230-280 g; nel neonato il peso è di circa 20 g (Fig. 17-1A).

Dal punto di vista topografico, il cuore si trova nella **cavità toracica**, al di sopra del diaframma e fra i due polmoni, in contatto anteriormente con sterno e cartilagini costali e posteriormente con la colonna vertebrale. Lo spazio in cui è situato è detto **mediastino anteriore**.

All'osservazione esterna il cuore appare lucido, in quanto avvolto da una sottile membrana detta **pericardio**, dello spessore di circa 2-4 mm, costituita da due strati distinti: uno esterno, il pericardio fibroso, e uno interno, il pericardio sieroso che aderisce perfettamente a tutte le parti piane e a tutte le insenature del cuore. Il **pericardio sieroso** è costituito da due sottili foglietti di cui il primo (foglietto parietale) a livello dell'origine dei grossi vasi del peduncolo vascolare si riflette nel secondo (foglietto viscerale o epicardio). Fra i due foglietti sono presenti normalmente da 20 a 50 ml di liquido chiaro roseo che permettono il movimento del cuore minimizzando l'attrito. Sotto all'epicardio si trovano due tonache una interna all'altra: il **miocardio** e l'**endocardio**. Il miocardio è costituito dalle fibre muscolari (cardiomiociti) responsabili delle contrazioni del cuore. L'endocardio è il rivestimento protettivo interno costituito da cellule endoteliali, ha la funzione di favorire lo scorrimento del sangue all'interno del cuore per evitare coaguli del sangue.

Il cuore è diviso in quattro cavità: gli **atri** (destro e sinistro) posti superiormente; i **ventricoli** (destro e sinistro) posti inferiormente. L'atrio e il ventricolo destro sono in continuità tra loro formando il cuore destro (che pompa il sangue venoso), così come comunicano l'atrio e il ventricolo sinistro, formando il cuore sinistro (che pompa il sangue arterioso). Ogni atrio comunica con il corrispondente ventricolo attraverso l'**orificio atrioventricolare** che è fornito di una valvola cuspidale: **valvola tricuspide** tra le cavità destre, **valvola bicuspide** o mitrale tra atrio sinistro e ventricolo sinistro (Fig. 17-1B).

Gli orifici che mettono in comunicazione le cavità cardiache con i vasi efferenti sono anch'essi protetti da valvole che impediscono il reflusso: **valvola semilunare polmonare** nel ventricolo destro per l'arteria polmonare, **valvola semilunare aortica** nel ventricolo sinistro per l'aorta.

Durante la vita il cuore si contrae in media 3 miliardi di volte con un ritmo di contrazioni nell'adulto intorno ai 70-75 battiti al minuto. Ad ogni contrazione il cuore pompa nell'aorta circa 80 ml di sangue. Il sangue può compiere un ciclo di circolazione in circa un minuto.

## I grossi vasi e le coronarie

Dalla porzione superiore della faccia anteriore del cuore si dipartono due vasi arteriosi: l'**aorta a sinistra** e l'**arteria polmonare** (o tronco polmonare) a destra (Fig. 17-1B). L'arteria polmonare si sfiocca in un ramo sinistro ed in un ramo destro. Le basi di queste arterie sono abbracciate dalle **auricole** (così chiamate poiché la loro forma ricorda le orecchie pendule di un cane) che fanno parte degli atri. Anche posteriormente sono presenti due vasi sanguigni: la **vena cava superiore** e la **vena cava inferiore** che sfociano nell'atrio destro. Tra questi quattro vasi si trovano le **vene polmonari destre e sinistre** che sfociano nell'atrio sinistro. Sulla superficie del cuore si possono osservare le **arterie coronarie destra e sinistra** che si dipartono dall'aorta. Le coronarie si diramano irrorando tutto il cuore fino all'apice.

## Vasi sanguigni

I vasi sanguigni costituiscono un sistema chiuso di tubi della lunghezza totale di circa 90 mila chilometri (più di due volte la circonferenza della terra), all'interno dei quali circola il sangue spinto dal cuore. Esistono tre tipi di vasi sanguigni: i **capillari**, le **arterie** e le **vene** (Fig. 17-2). I capillari sono i vasi più piccoli, con un diametro di circa 5-10 μm a seconda della tipologia di capillare. La loro parete è costituita da **cellule endoteliali**, una lamina basale e occasionali cellule contrattili, chiamate **periciti**. I capillari possono essere di tre tipi: capillari con endotelio continuo, con endotelio fenestrato e sinusoidi con endotelio fenestrato e discontinuo. Le arterie e le vene comprendono vasi di vario diametro e possiedono una parete formata da tre strati o tonache: **intima**, **media** ed **avventizia**. Le arterie possono essere di tre tipi: arterie elastiche (diametro superiore a 2,5 cm), muscolari (diametro di circa 0,4 cm) ed arteriole (diametro inferiore a 0,4 cm). Le vene presentano dimensioni variabili da meno di 1 mm a 4 cm di diametro in base al quale vengono suddivise in piccole (venule), medie e grandi. Per la descrizione delle caratteristiche istologiche dei vasi sanguigni si rimanda ai testi di Istologia.

## Vasi linfatici

I **vasi linfatici** svolgono la funzione di drenaggio per raccogliere l'eccesso dei liquidi tessutali e riportarli nel sangue venoso appena prima che sbocchi nel cuore. Il sistema linfatico è una componente specializzata del sistema circolatorio, composto da: linfa, vasi linfatici, linfonodi, tonsille, adenoidi, timo, milza e noduli isolati di tessuto linfatico (follicoli linfatici) come le placche di Peyer nell'intestino (Fig. 17-3). I vasi linfatici nascono a fondo cieco, negli spazi intercellulari del tessuto connettivo lasso; non formano una circolazione chiusa. Si trovano vasi linfatici fino nelle più sottili lamine del tessuto connettivo lasso, dove svolgono le loro funzioni di drenaggio e difesa. Si congiungono in vasi e dotti afferenti sempre più ampi, fino a raggiungere un linfonodo (centro di monitoraggio della linfa). La linfa esce dal linfonodo in un unico vaso (efferente) e prosegue verso il prossimo linfonodo fino alla confluenza giugulo-succlavia, situata ai due lati nel collo, dove il dotto toracico e il dotto linfatico destro si riversano nel sistema venoso, all'origine delle due vene brachiocefaliche.

I vasi linfatici hanno un calibro variabile e una struttura simile alle vene, ma con pareti più sottili, hanno un numero maggiore di valvole e presentano lungo il loro decorso i linfonodi. Le radici dell'albero linfatico sono formate da esili vasi linfatici, chiamati capillari linfatici,

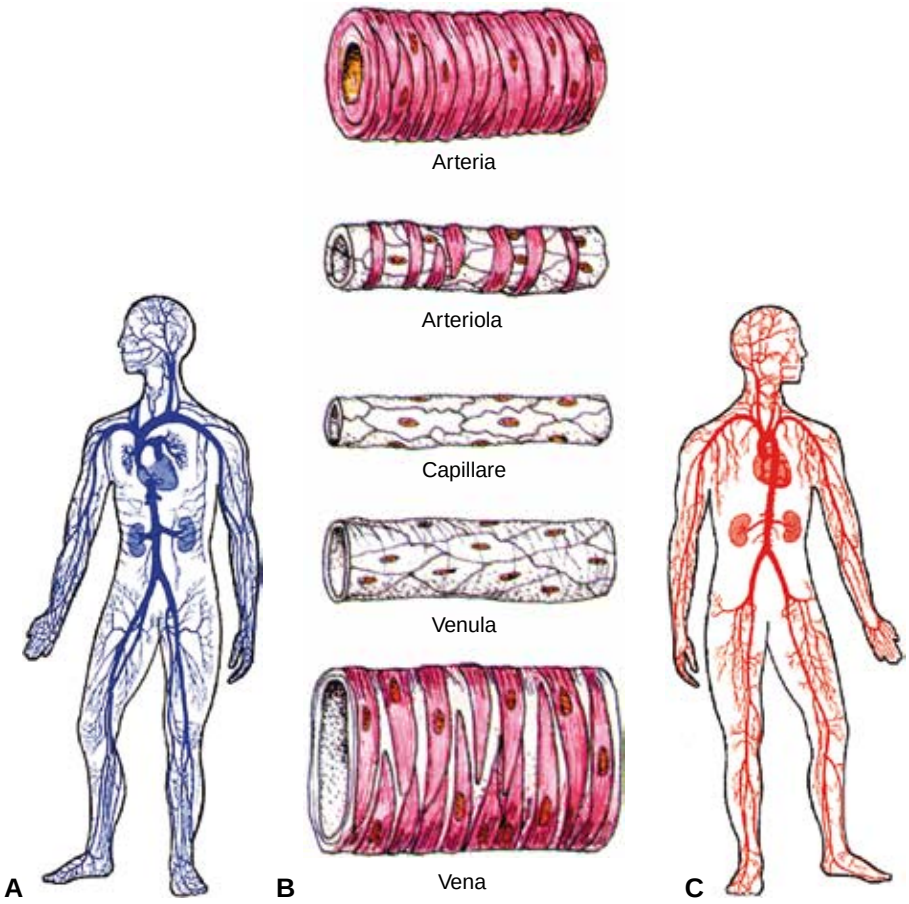



**FIGURA 17-2** ■ Schema dei principali tipi di vasi sanguigni.

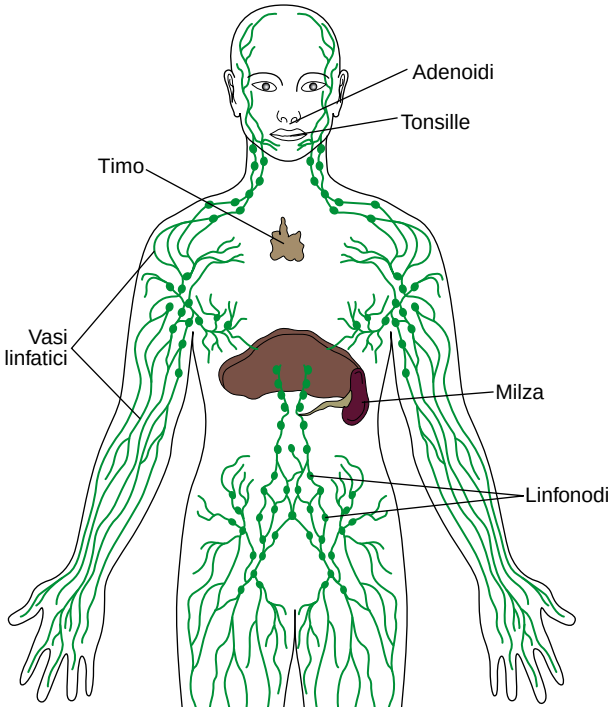



**FIGURA 17-3** ■ Componenti del sistema linfatico.

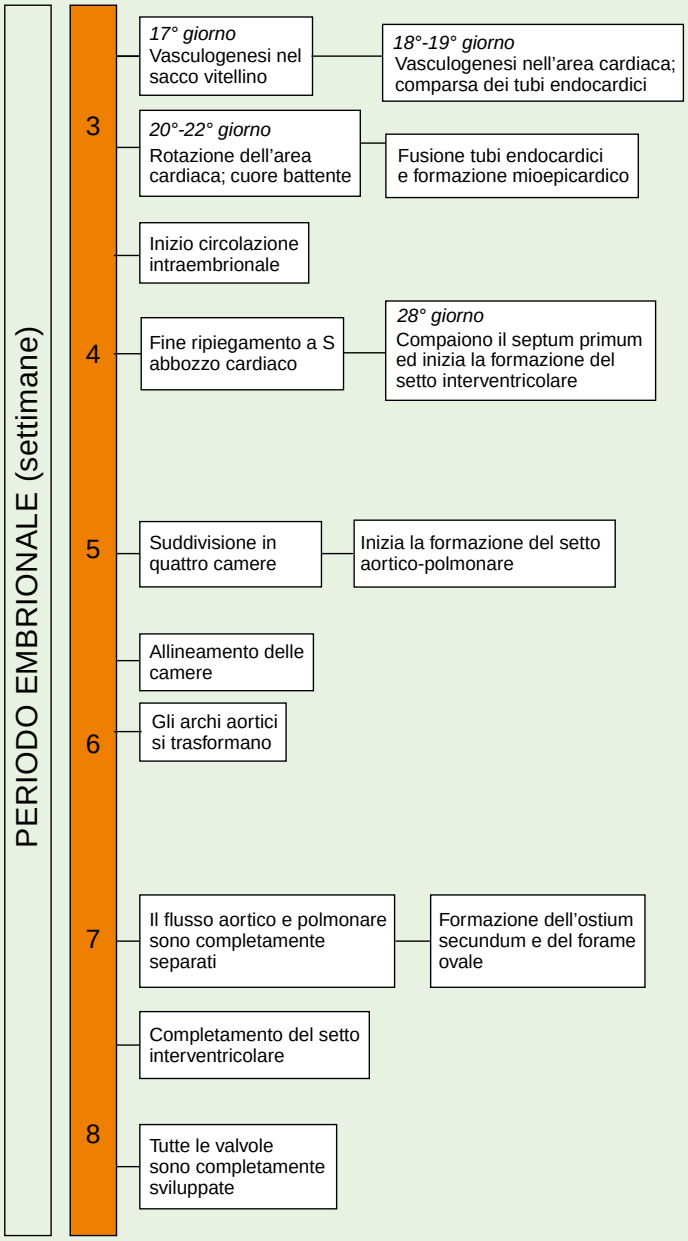
che possiedono una parete formata da una sola lamina di cellule endoteliali. Col crescere del diametro dei vasi linfatici partendo dai capillari, le pareti diventano più spesse fino ad avere tre strati simili a quelli delle vene. Sono presenti valvole semilunari ogni pochi millimetri nei grossi linfatici e anche più frequentemente nei linfatici più piccoli.

La linfa scorre lentamente (due-tre giorni per un ciclo di circolazione) attraverso il sistema nella direzione giusta per il grande numero di valvole. Gli atti respiratori e le contrazioni della muscolatura scheletrica producono un gradiente di pressione nella linfa come avviene nel sangue venoso; coinvolti anche movimenti di peristalsi e pulsazione di arterie.

## FORMAZIONE DEI PRIMI VASI SANGUIGNI: VASCULOGENESI ED ANGIOGENESI

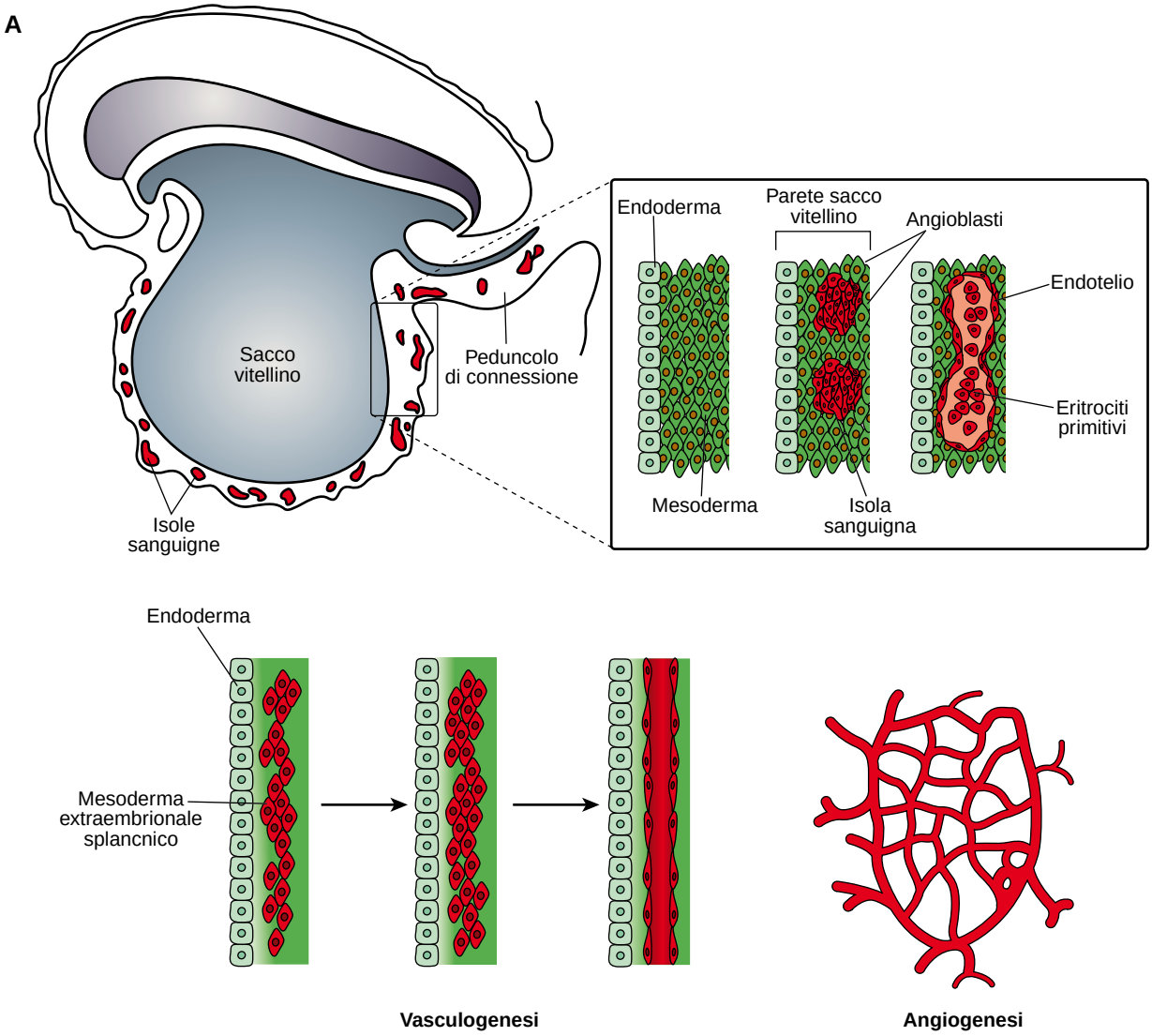
Il sistema circolatorio sanguigno è il primo dei sistemi del corpo umano che inizia a formarsi; compare verso la fine della 3ª settimana di sviluppo, quando l'embrione non è più in grado di far fronte alle sue necessità nutrizionali solo mediante diffusione, in quanto le strutture iniziano ad avere una significativa dimensione ed estensione e per poter raggiungere i distretti tissutali

## TABELLA CRONOLOGICA DELLO SVILUPPO DEL CUORE E DEL SISTEMA CIRCOLATORIO SANGUIGNO




periferici occorre che si formi un supporto alla semplice diffusione.

I primi vasi cominciano a formarsi verso la fine della 3ª settimana al di fuori dell'embrione, nel **mesoderma extraembrionale splancnico** della parete del sacco vitellino e del peduncolo di connessione (Fig. 17-4). Nell'embrione i vasi e l'abbozzo del cuore cominciano a formarsi subito dopo dal **mesoderma intraembrionale splancnico**. Le modalità di formazione ex novo dei vasi extra- ed intraembrionali sono le stesse; il processo è chiamato **vasculogenesi**. In breve, le modalità di tale processo sono le seguenti. Cellule mesodermiche differenziano in **angioblasti** o **emangioblasti** che si raggruppano per formare aggregati chiamati **isole sanguigne**. All'interno di ogni isola gli angioblasti più esterni si differenziano in **cellule endoteliali** che formano la parete del vaso, mentre gli angioblasti più interni si differenziano in **eritrociti primitivi**. In altri casi, gli angioblasti si staccano dal mesoderma e si raggruppano al di fuori del sito di origine per formare vasi direttamente all'interno di tessuti limitrofi. In ogni caso, una volta formatosi, un vaso si allunga, si ramifica e prende contatto con altri vasi per




B

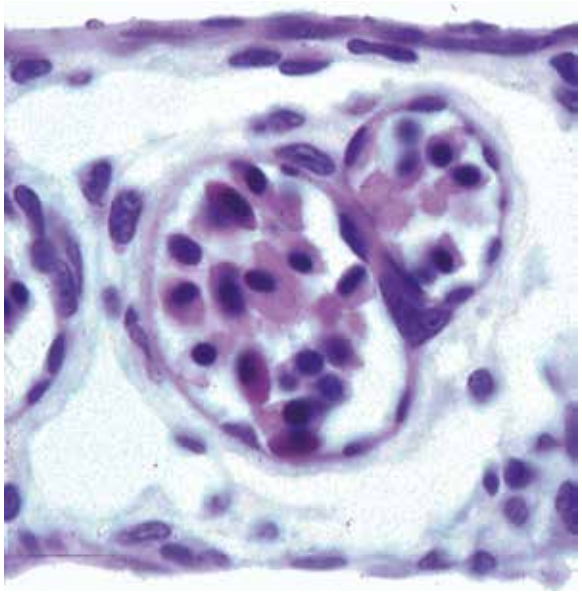


**Figura 17-4** ■ *A)* In alto formazione delle isole sanguigne nel mesoderma extraembrionale della parete del sacco vitellino. In basso schema di vascologenesi e angiogenesi. *B)* Sezione istologica di isole sanguigna nella parete del sacco vitellino.

proliferazione delle cellule endoteliali. Questo processo è chiamato **angiogenesi** (Fig. 17-4). Mediante vasculogenesi ed angiogenesi i vasi formatesi fuori dell'embrione negli annessi embrionali (sacco vitellino e corion) si uniscono con i vasi formatesi all'interno dell'embrione realizzando una rete vasale continua. La formazione dei vari tipi di vasi (capillari, arterie e vene) si completerà con l'apposizione esternamente all'endotelio di altri tessuti (connettivo e muscolare liscio) che completeranno la parete del vaso (tonaca intima, media ed avventizia).

## FORMAZIONE DELLE CELLULE DEL SANGUE

Come descritto nel paragrafo precedente, gli angioblasti delle isole sanguigne possono differenziare sia in cellule endoteliali che in eritrociti primitivi (vedi anche paragrafo "Processi e molecole"). Gli eritrociti primitivi sono dunque le prime cellule del sangue che si formano nell'embrione. Si tratta di eritrociti che possiedono il nucleo e che producono emoglobina embrionale e successivamente fetale formate da 4 catene polipeptidiche ($\zeta_2$ $\varepsilon_2$ emoglobina embrionale e $\alpha_2$ $\gamma_2$, emoglobina fetale) diverse da quelle dell'emoglobina adulta ($\alpha_2$ $\beta_2$). L'emoglobina embrionale e fetale hanno una maggiore affinità per l'$O_2$ rispetto all'emoglobina adulta e sono quindi più efficienti nel catturare l'ossigeno a livello della placenta. L'emoglobina adulta comincia ad essere prodotta verso il 4° mese fetale e diventa l'emoglobina prevalente tra la 18ª e la 24ª settimana. Come sopra descritto, la prima forma di emopoiesi avviene all'interno dei vasi e per questo è chiamata **emopoiesi intravasale**, avviene nel mesoderma extraembrionale splancnico e produce esclusivamente eritrociti primitivi. Gli angioblasti da cui ha origine, sono considerati **cellule staminali ematopoietiche** (HSC, hematopoietic stem cells) in quanto capaci di autoriprodursi e differenziare in questo primo periodo in eritrociti e cellule endoteliali. Le HSC del sacco vitellino, tuttavia, sono dotate di capacità di autorinnovamento limitata e, pur potenzialmente in grado di dare origine a granulociti e monociti, come dimostrato da esperimenti di coltura in vitro, di norma non manifestano tale multipotenza nell'embrione. Si ritiene che queste cellule staminali non partecipino all'emopoiesi definitiva che verrà stabilita successivamente nel fegato/milza e poi nel midollo osseo. Intorno alla 5ª-6ª settimana, il fegato comincia a svolgere funzione emopoietica e diventerà, nelle successive settimane, il principale organo emopoietico dell'embrione, coadiuvato in parte dalla milza. L'**emopoiesi epatica** avviene a partire da HSC in grado di dare origine ad eritrociti definitivi, megacariociti (cellule che formano le piastrine) e a diverse classi di leucociti (granulociti, monociti e linfociti B); i linfociti T iniziano a differenziare nel timo verso la fine del periodo embrionale a partire da linfociti immaturi provenienti dal fegato. Le HSC del fegato non si formano, tuttavia, in questo organo, ma migrano al suo interno attraverso la circolazione dopo essersi probabilmente formate nel mesenchima di una regione dell'embrione sita tra l'aorta dorsale, la gonade e l'adiacente mesonefro e per questo chiamata **AGM** (aorta, gonade, mesonefro). La maggior parte degli autori ritiene che i precursori di queste cellule staminali siano cellule mesenchimali originatesi con meccanismi molecolari ancora poco chiari dalla splancnopleura. Questi precursori si localizzano nei pressi dell'aorta dorsale e divenuti HSC non fanno emopoiesi localmente nell'AGM, ma si gettano nell'aorta per raggiungere il fegato. Verso la metà del periodo embrionale il fegato comincia a perdere la sua funzione emopoietica e la maggior parte delle HSC si spostano nel **midollo osseo** per mezzo della circolazione sanguigna. Il midollo osseo diventa gradualmente la sede definitiva dell'emopoiesi (Fig. 17-5).

## SVILUPPO DEGLI ORGANI LINFOIDI

Gli organi linfoidi primari sono, come descritto, lo stesso midollo osseo, dove vengono prodotti i linfociti B maturi e i precursori dei linfociti T e il **timo** dove si formano i linfociti T maturi. Come esposto nel paragrafo precedente, il midollo osseo inizia la sua attività emopoietica intorno al 4° mese di sviluppo e diventa progressivamente la principale sede dell'emopoiesi. La componente epiteliale del timo (cellule reticolo-epiteliali) si sviluppa da proliferazioni di cellule dell'endoderma delle III tasche branchiali (vedi Capitolo 14). Tra la 4ª e la 6ª settimana due abbozzi del timo si staccano dalle tasche e si fondono in posizione ventrale. Dalla 9ª-10ª settimana nel timo cominciano a differenziare i linfociti T. I principali organi linfoidi secondari (**tonsille**, **milza**, **linfonodi** e **placche di Peyer** delle mucose) hanno varie derivazioni. Le tonsille (palatine, faringee, tubariche e linguali) derivano, per la componente epiteliale, dall'endoderma dell'intestino primitivo. Lo stroma connettivale della milza origina da cellule mesenchimali del mesogastrio dorsale (una lamina di mesoderma splancnico che ancora lo stomaco alla parete celomatica, vedi Capitolo 15), quello dei linfonodi da cellule mesenchimali che si dispongono lungo il percorso dei **vasi linfatici** in formazione. Questi si formano per gemmazione dell'endotelio delle vene. I primi vasi linfatici hanno origine dalle vene cardinali e giugulari a partire dalla 6ª settimana ed i primi linfonodi sono visibili tra l'8ª e l'11ª settimana. Infine le placche di Peyer si formano, come aggregati di linfociti e cellule dendritiche (cellule APC, antigen presenting cells), che originano probabilmente dalle cellule delle creste neurali (vedi Capitoli 10 e 13), al di sotto della mucosa dell'intestino tenue. Solamente dopo il 6° mese è possibile osservare alcune decine di placche nella loro sede intestinale.

## LO SVILUPPO DEL CUORE

VIDEO 7

Il cuore è il primo organo funzionale che si forma durante lo sviluppo. Esso comincia ad abbozzarsi intorno al 19° giorno sottoforma di due tubicini formati da angioblasti originatesi dal mesoderma splancnico della regione craniale (Fig. 17-6). Nel paragrafo "Processi e molecole" riporteremo le più recenti informazioni che riguardano i segnali e i principali meccanismi molecolari che regolano la formazione di questi angioblasti destina-

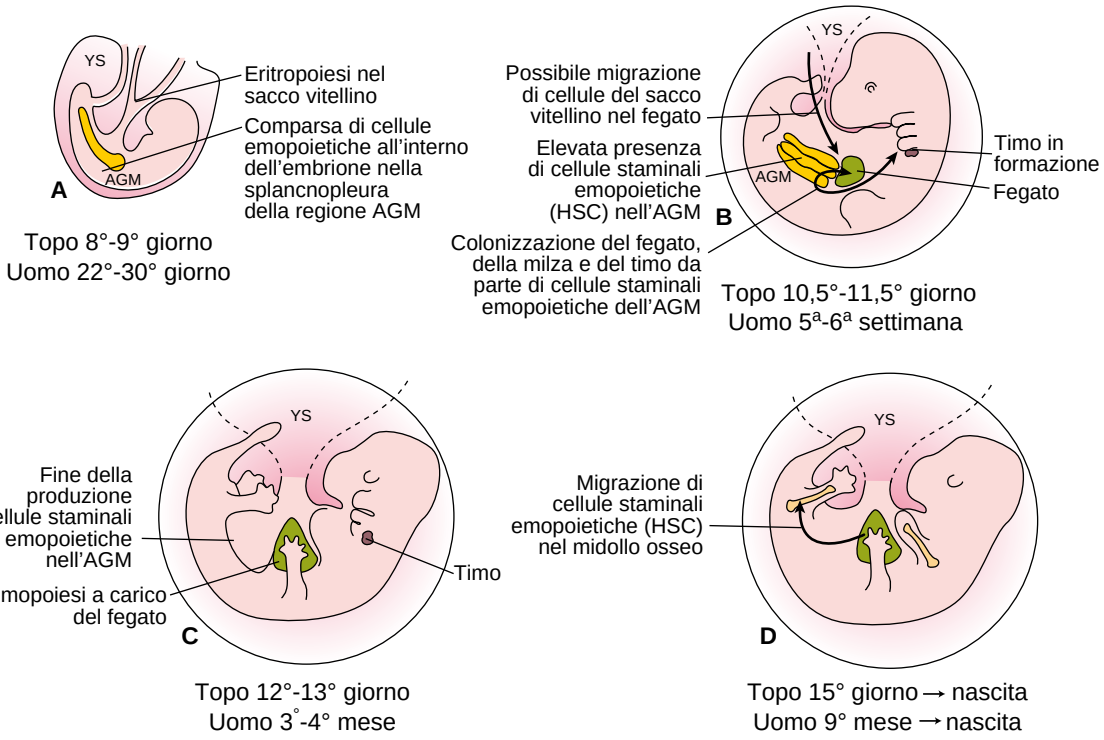



**Figura 17-5** ■ Fasi dell'emopoiesi nell'embrione di topo e umano. La sequenza degli eventi è simile, ma i tempi sono ovviamente differenti. Tre fasi si susseguono, sovrapponendosi, a partire dall'8° giorno nel topo e dal 22° giorno nell'uomo: emopoiesi nel sacco vitellino, nel fegato e nel midollo osseo. Nell'uomo negli ultimi tre mesi di gestazione l'emopoiesi avviene principalmente a carico del midollo osseo. YS = yolk sac, sacco vitellino; AGM = aorta-gonad-mesonephros.

ti a differenziare principalmente nelle cellule endoteliali dell'endocardio e negli angiociti o cardiomiociti del miocardio. In questa sezione descriveremo prima i processi che in circa dieci giorni, dal 19° al 28° giorno, portano alla formazione dell'abbozzo del cuore e quindi analizzeremo lo sviluppo delle diverse regioni del cuore nelle successive quattro settimane; al termine del periodo embrionale (8 settimane) questi processi portano alla formazione di un piccolo cuore funzionante pressoché completo in tutte le sue parti.

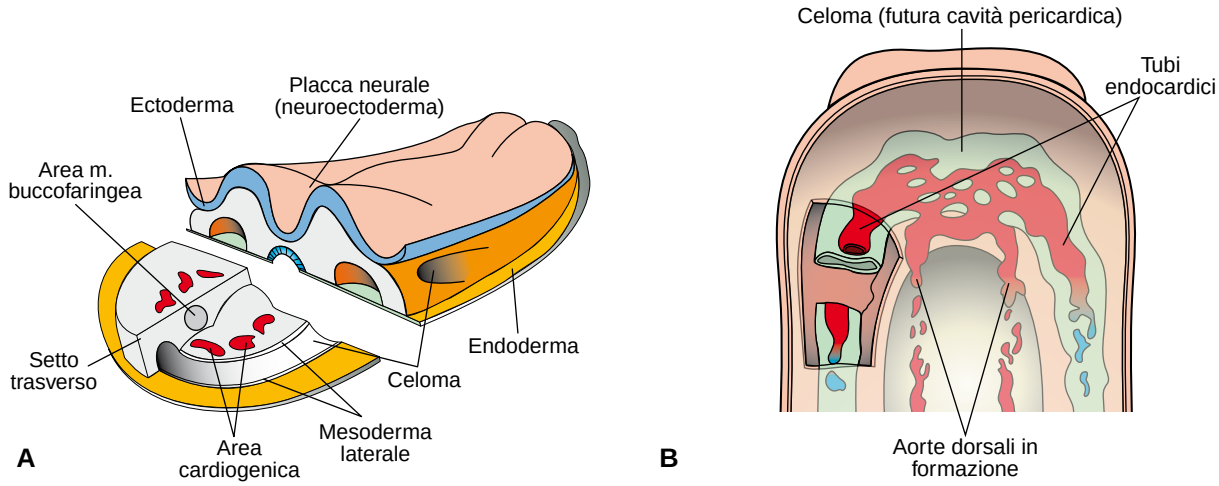



**Figura 17-6** ■ *A)* Vista dall'alto dell'embrione verso la fine della 3ª settimana sono visibili la placca neurale, l'area cardiogenica situata al di sotto del neuroectoderma e davanti alla membrana buccofaringea. *B)* Visione ventrale della regione anteriore in cui nell'ambito del plesso vasale si sono formati i due tubi endocardici e sono in via di formazione le aorte dorsali.

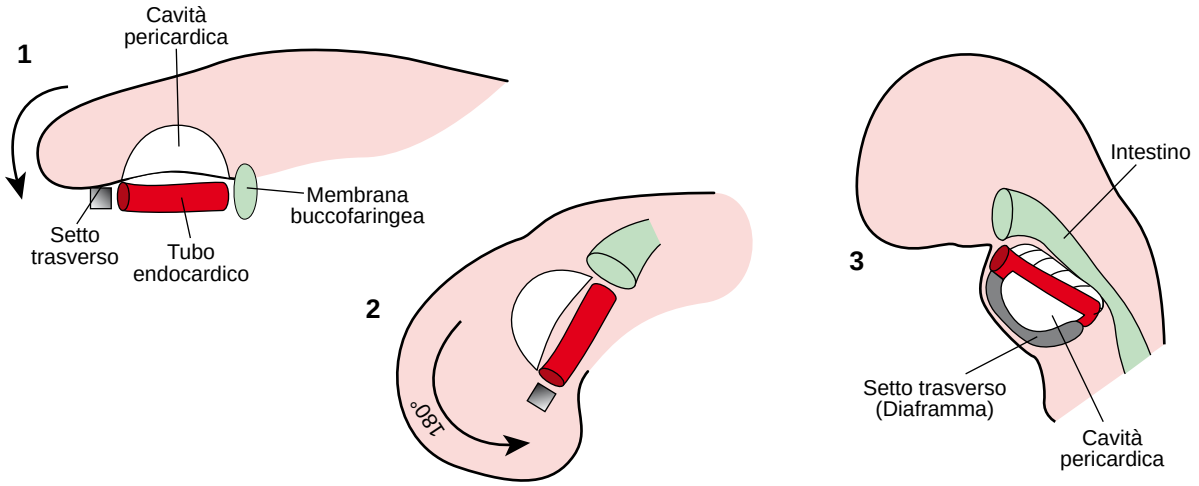



**Figura 17-7** ■ Schema di tre fasi della rotazione della regione craniale dell'embrione che causano la rotazione di 180° della regione cardiogenica e il cambiamento di posizione delle strutture adiacenti.

## 19°-23° giorno

Il cuore deriva dal **mesoderma laterale**. I primi abbozzi compaiono nella regione cefalica verso la fine della 3ª settimana di sviluppo prima della delimitazione della forma cilindrica dell'embrione (Fig. 17-6A). Cellule del mesoderma splancnico di questa regione, già determinate nel loro differenziamento durante la gastrulazione, si staccano dal mesoderma e differenziano in **angioblasti**. Gli angioblasti formano inizialmente una rete a forma di ferro di cavallo di piccoli vasi sanguigni nella quale prendono forma due **tubi endocardici primitivi** destro e sinistro e due vasi longitudinali, le **aorte dorsali**. Rapidamente queste ultime formano i **primi archi aortici** che descriveremo più avanti (Fig. 17-6B). Anche i vasi che portano il sangue al cuore che costituiscono un sistema di vene che pure descriveremo più avanti, prendono rapidamente contatto con la regione posteriore di ingresso di sangue dei tubi endocardici. Recenti risultati ottenuti su embrioni di uccelli e di roditori indicano che nel mesoderma splancnico delle regione cefalica i precursori degli angioblasti destinati a dare origine ai tessuti cardiaci sono localizzati in due regioni bilaterali chiamate **campi cardiaci primari** e **secondari**, destinate a dare origine ad angioblasti che formano regioni distinte dei tubi cardiaci. In altre parole la formazione dei tubi endocardici primitivi è seguita, mentre questi cominciano a fondersi tra loro, dalla formazione di altri due tubicini che si dispongono un po' più avanti e in posizione ventro-mediale rispetto ai tubi primitivi fondendosi con essi. Mentre questi ultimi sono destinati a formare principalmente le regioni di influsso di sangue nel cuore, i secondi prendendo contatto con le aorte dorsali formano le regione di efflusso dal cuore. Discuteremo di questi risultati più avanti nel paragrafo " Processi e molecole".

Per effetto della crescita del prosencefalo (tubo neurale, vedi Capitolo 13) in direzione craniale, dell'ampliamento della primitiva cavità pericardica (porzione del celoma intraembrionale sita al di sopra dei tubi endocardici) e della crescita dell'intestino anteriore, la regione centrale dell'area cardiogenica ruota in circa 48 ore (21° e 23° giorno) di quasi 180° prima in basso e poi dorsalmente, spostando i tubi endocardici in fusione da una posizione ventrale alla cavità pericardica, posteriore al setto trasverso (futuro diaframma) e anteriore alla membrana buccofaringea, ad una posizione che diventa dorsale alla cavità pericardica, superiore al diaframma e ventrale all'intestino anteriore (Fig. 17-7). Allo stesso tempo, il sollevamento dei margini laterali dell'embrione avvicina i tubi endocardici che si fondono in direzione antero-posteriore. Contemporaneamente i tubi vengono circondati dalla splancnopleura che forma il cosiddetto **mantello mioepicardico** (miocardio-epicardio) che darà origine ai cardiomiociti del **miocardio** e all'**epicardio** (o pericardio viscerale). L'avvolgimento del mantello intorno ai tubi endocardici sembra riguardare principalmente la regione originata dal campo cardiaco primario. Difatti, gli angioblasti del campo secondario sono in grado di formare sia l'endotelio che i cardiomiociti del miocardio (vedi paragrafo "Processi e molecole"). Il **pericardio parietale** si forma dalla limitrofa somatopleura che si accolla al mantello mioepicardico. Tra il mantello mioepicardico e l'endocardio compare una matrice acellulare chiamata **gelatina cardiaca** secreta dalle cellule endoteliali e formata da collagene, fibre elastiche e proteoglicani. La gelatina ammortizza i movimenti e le prime contrazioni dell'abbozzo cardiaco (Fig. 17-8). Inoltre essa, legando fattori di crescita e altre molecole, è necessaria per i movimenti delle cellule che vanno a formare i setti divisori delle camere cardiache (vedi più avanti) e il differenziamento delle cellule endoteliali. Al termine dei ripiegamenti dell'abbozzo del cuore, che descriveremo nel prossimo paragrafo, la gelatina progressivamente scompare dalle pareti cardiache concentrandosi nelle regioni che separano gli atri dai ventricoli e di efflusso del sangue dai ventricoli dove contribuisce alla formazione dei cuscinetti endocardici.

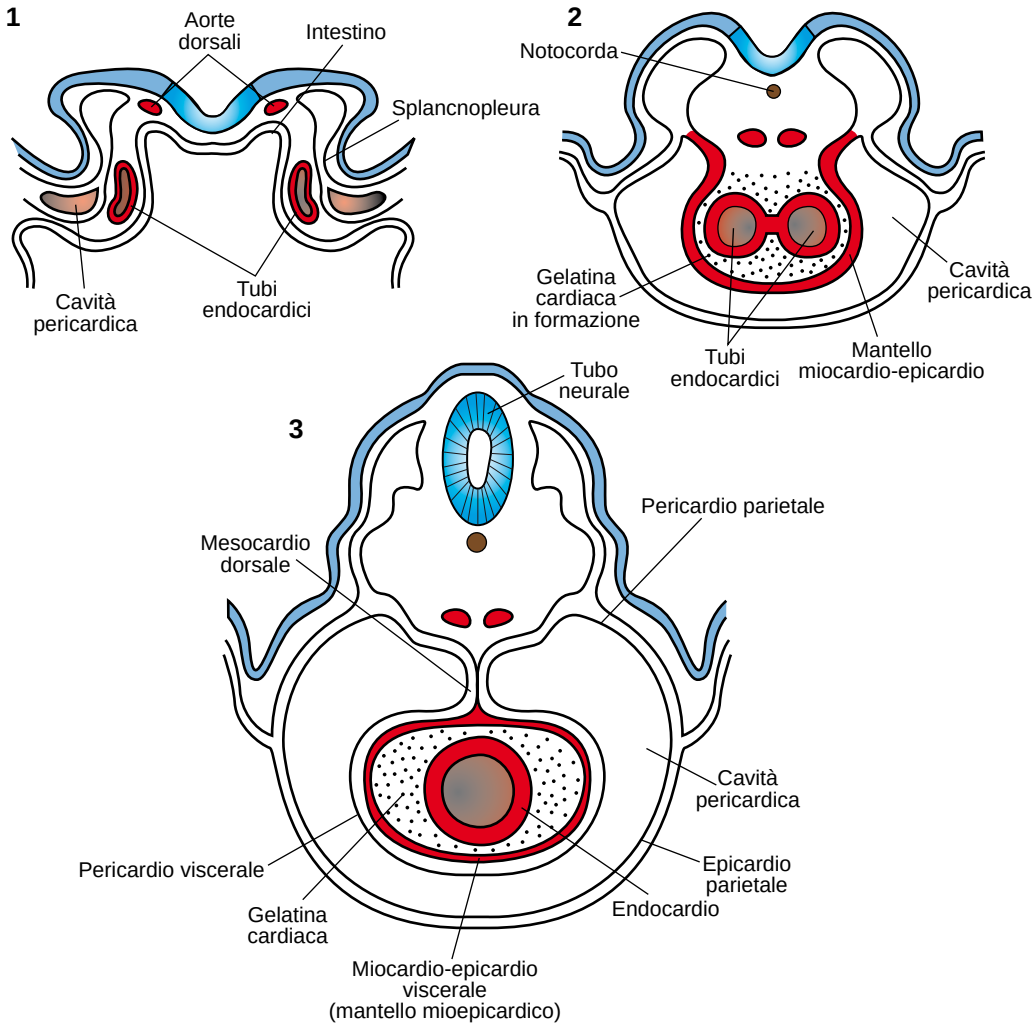



**Figura 17-8** ■ Sezioni trasversali dell'area cardiogenica che illustrano la fusione dei tubi endocardici, la formazione della parete mioepicardica dell'abbozzo del cuore e il suo inglobamento nella cavità pericardica.

Mentre l'area cardiogenica ruota, i tubi cardiaci continuano a fondersi per tutta la loro lunghezza, ed intorno ad essi si completa l'avvolgimento del mioepicardio. Nell'abbozzo del cuore, ora quasi interamente situato all'interno della cavità pericardica ed ad essa sospeso dal **mesocardio dorsale**, la formazione di solchi e rigonfiamenti consente di distinguere quattro regioni: il **bulbo**, il **ventricolo primitivo**, l'**atrio primitivo** e il **seno venoso** (inoltre la regione che collega il bulbo al 1° arco aortico è detta **sacco aortico**) (Fig. 17-9).

Le prime contrazioni irregolari del cuore si osservano tra il 22° e il 23° giorno, esse sono dovute al differenziamento di speciali cardiomiociti con funzione di "pacemaker" nella regione dell'atrio primitivo destinata a diventare parte dell'atrio destro (nodo senoatriale).

## 23°-28° giorno

Tra il 23° e il 25° giorno l'abbozzo cardiaco tubulare si allunga e si ripiega. Poiché è fissato alla cavità pericardica dal mesocardio dorsale, subisce dei piegamenti che gli fanno assumere una forma a S e che portano le primitive quattro regioni a modificare la loro relativa posizione (Fig. 17-9). Alla fine di questo movimento il mesocardio dorsale scompare e il cuore rimane sospeso nella cavità pericardica mediante i vasi sanguigni ad esso collegati al polo caudale e craniale. Mentre il cuore si ripiega, si formano delle evidenti espansioni in corrispondenza delle quattro regioni che lo suddividono ora chiaramente e che in direzione cranio-caudale sono: **bulbo** (suddivisibile a sua volta in tre regioni **tronco arterioso**, **cono arterioso** e **segmento ventricolare**, futuro ventricolo destro), **ventricolo primitivo** (futuro ventricolo sinistro), **atrio primitivo** (con due espansioni che rappresentano regioni del futuro atrio destro e atrio sinistro) e **seno venoso** che si estende in due espansioni laterali, il **corno destro** e **sinistro** (Figg. 17-10, 17-12 e 17-13).

Durante il ripiegamento il bulbo si sposta in avanti e a destra, il ventricolo primitivo a sinistra e l'atrio

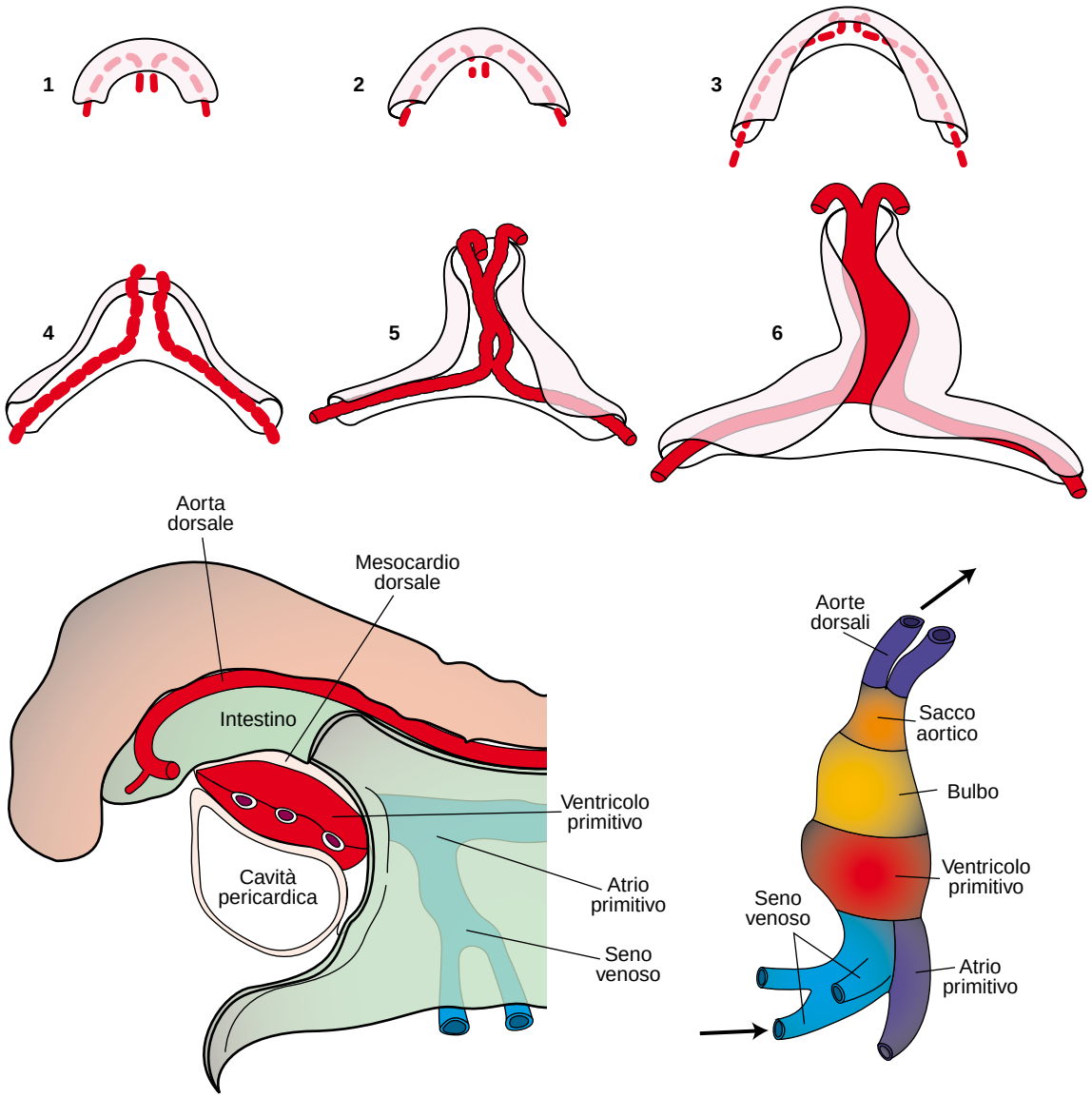



**Figura 17-9** ■ In alto schema delle modificazioni dell'area cardiogenica e dei tubi cardiaci in rapporto alla cavità pericardica; notare il cambiamento di posizione della cavità rispetto ai tubi endocardici da dorsale a ventrale ed il progressivo inglobamento dei tubi in via di fusione da parte della parete della cavità pericardica che formerà il mantello mioepicardico. In basso a sinistra posizione dell'abbozzo cardiaco alla fine della rotazione e prima della completa fusione dei tubi endocardici in un embrione di circa 24 giorni. A destra l'abbozzo cardiaco isolato suddiviso in 5 regioni (sacco aortico, bulbo, ventricolo primitivo, atrio primitivo, seno venoso) con una via di influsso e una di efflusso del sangue.

primitivo con il seno venoso indietro e in alto. L'atrio primitivo all'inizio dei piegamenti è ancora fuori della cavità pericardica, alla fine si ritrova al suo interno. La giunzione tra il segmento ventricolare del bulbo e il ventricolo primitivo esternamente segnata dal **solco bulboventricolare**, è uno stretto canale detto **canale interventricolare primitivo**. La cavità dell'atrio primitivo comunica con quella del ventricolo primitivo per mezzo del **canale atrioventricolare** (Figg. 17-11 e 17-12A).

Alla fine della 4ª settimana l'endocardio forma delle estroflessioni o diverticoli che invadono la gelatina spingendosi all'interno del miocardio; i cardiomiociti indotti da segnali provenienti dall'endocardio (vedi "Processi e molecole") proliferano formando una rete di cordoni cellulari intrecciati o **trabecole**. Queste dopo una fase di espansione, collassano dando origine alle pareti dei ventricoli (**compattazione del miocardio**). Questi processi sono fondamentali per lo sviluppo della funzionalità del cuore in quanto aumentano da una parte la capacità del-

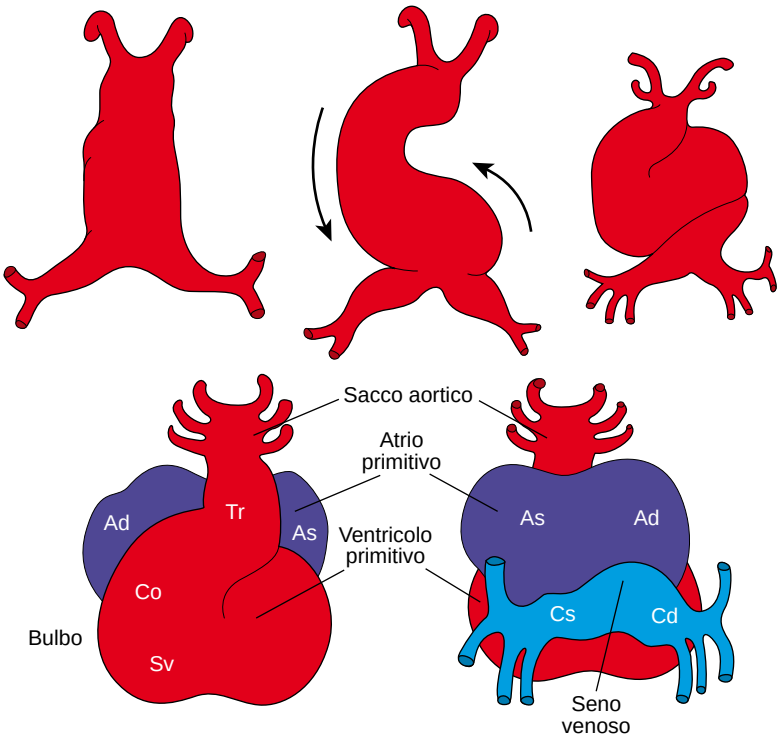



**Figura 17-10** ■ Rotazione dell'abbozzo cardiaco visto di fronte (in alto) e suo aspetto anteriore e posteriore (in basso) alla fine dei movimenti. Notare le tre regione del bulbo e i due corni del seno venoso. Tr = tronco, Co = cono, Sv = segmento ventricolare, Cs = corno sinistro, CD = corno destro, As = atrio sinistro, Ad = atrio destro.

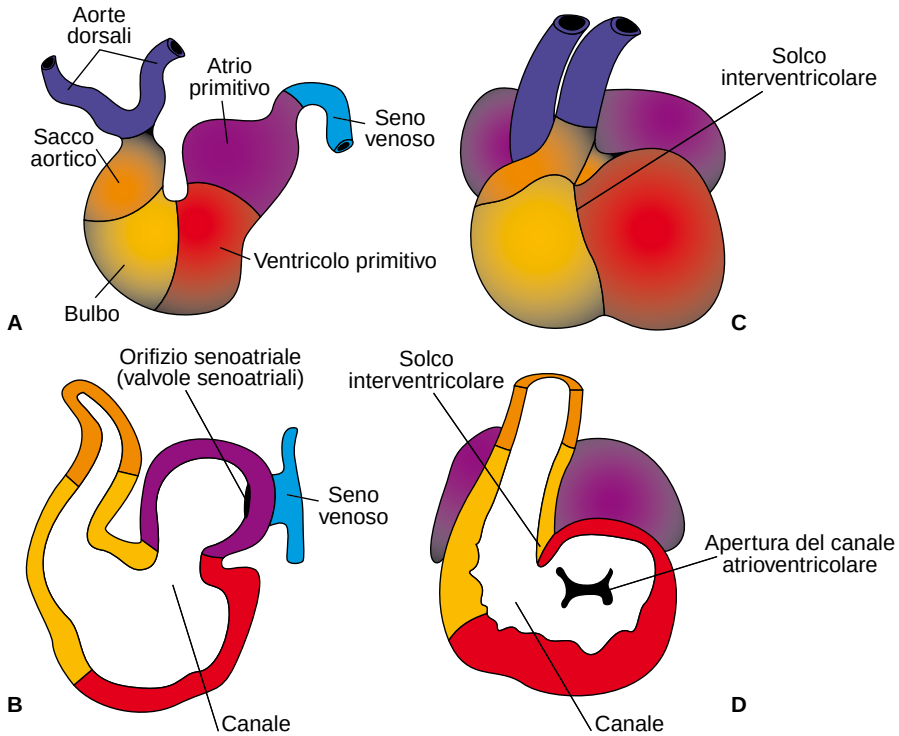



**Figura 17-11** ■ Abbozzo cardiaco tra il 24° e il 28° giorno. Visione laterale dell'esterno *(A,C)* e dell'interno *(B,D)* dell'abbozzo durante il ripiegamento (*A,B*), e alla fine del ripiegamento *(C,D)*.

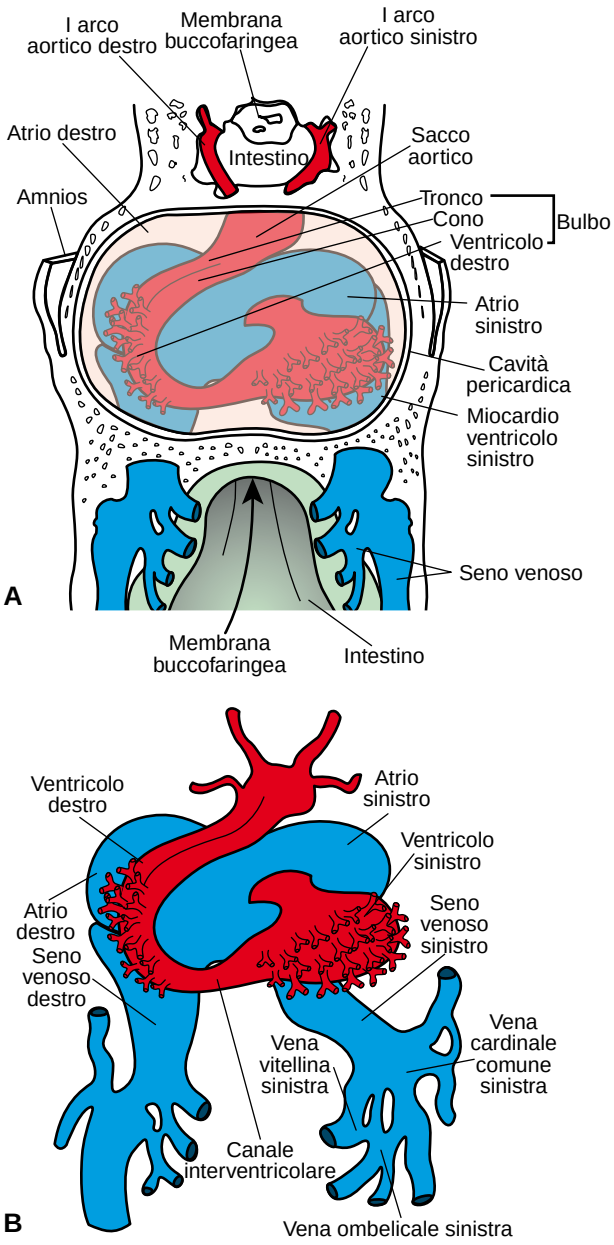



**Figura 17-12** ■ *A)* Visione ventrale dell'abbozzo del cuore nella cavità pericardica verso il 25° giorno. *B)* Tubi endocardici privati del miocardio-epicardio per evidenziare i diverticoli dei ventricoli primitivi.

le camere ventricolari e dall'altra la loro forza contrattile (Fig. 17-12B).

## LA CIRCOLAZIONE SANGUIGNA ALLA FINE DELLA QUARTA SETTIMANA

Alla fine della 4ª settimana il cuore è un tubicino ripiegato lungo meno di 1 mm con una sottile parete a tre strati (epicardio, miocardio ed endocardio) e quattro dilatazioni due a livello degli atri primitivi e due dei ventricoli primitivi; atri e ventricoli primitivi sono ancora indivisi. L'abbozzo del cuore è contenuto nella cavità pericardica ed ha un flusso sanguigno unidirezionale.

Nel seno venoso riceve sangue ossigenato dalle **vene ombelicali** e sangue venoso dalle **vene cardinali** e **vitelline**; il sangue passa quindi nell'atrio primitivo (orificio senoatriale con valvole senoatriali) e nel ventricolo primitivo (canale atrioventricolare) e infine nel bulbo (canale interventricolare) e nel sacco aortico. Da qui attraverso le due **aorte dorsali** fluisce al corpo dell'embrione tramite le **arterie intersegmentali**, al sacco vitellino tramite l'**arteria vitellina** e torna alla placenta tramite le **arterie ombelicali** per essere riossigenato (Fig. 17-13).

In questo stadio l'embrione ha una lunghezza CR (Crown-Rump = Vertice-Coccige, vedi Capitolo 6) di circa 5-6 mm, pesa poco più di mezzo grammo e contiene circa 50 µl di sangue; il cuore si contrae ad un ritmo irregolare di circa 100 battiti al minuto.

## L'ABBOZZO DEL CUORE DALLA QUINTA ALL'OTTAVA SETTIMANA

I principali processi morfogenetici che si verificano nel corso del secondo mese di sviluppo del cuore possono essere così riassunti:

- cambiamenti nel seno venoso e formazione degli atri e dei ventricoli definitivi;
- suddivisione dell'iniziale unica camera del cuore in quattro camere a seguito della formazione dei setti interatriali tra l'atrio primitivo di destra e di sinistra e del setto interventricolare tra il ventricolo primitivo di destra e di sinistra. Contemporaneamente il canale atrio-ventricolare a seguito della formazione del septum intermedium si sdoppia in due canali atrio-ventricolare destro e sinistro sicché ogni atrio comunica con il suo corrispettivo ventricolo
- formazione del setto spirale aortico-polmonare nelle regioni del cono e del tronco arterioso, che porta alla formazione del tronco aortico-polmonare.

### Cambiamenti nel seno venoso e delle vene associate

Inizialmente il seno venoso è una camera separata dall'abbozzo del cuore e si apre nella parete dorsale dell'atrio primitivo destro mediante l'**orificio senoatriale**. Il seno è formato da due dilatazioni il **corno destro** che riceve la vena cardinale comune destra, la vena vitellina di destra e la vena ombelicale destra ed il **corno sinistro** che riceve la vena cardinale comune sinistra, la vena vitellina sinistra e la vena ombelicale sinistra (Fig. 17-12B). Inizialmente il sistema circolatorio ha uno sviluppo simmetrico, ma a partire dalla 5ª settimana **la circolazione del sangue viene spostata progressivamente a destra** attraverso un sistema di anastomosi e regressione dei vasi della parte sinistra.

L'evoluzione del seno venoso comprende i seguenti principali processi (Fig. 17-14):

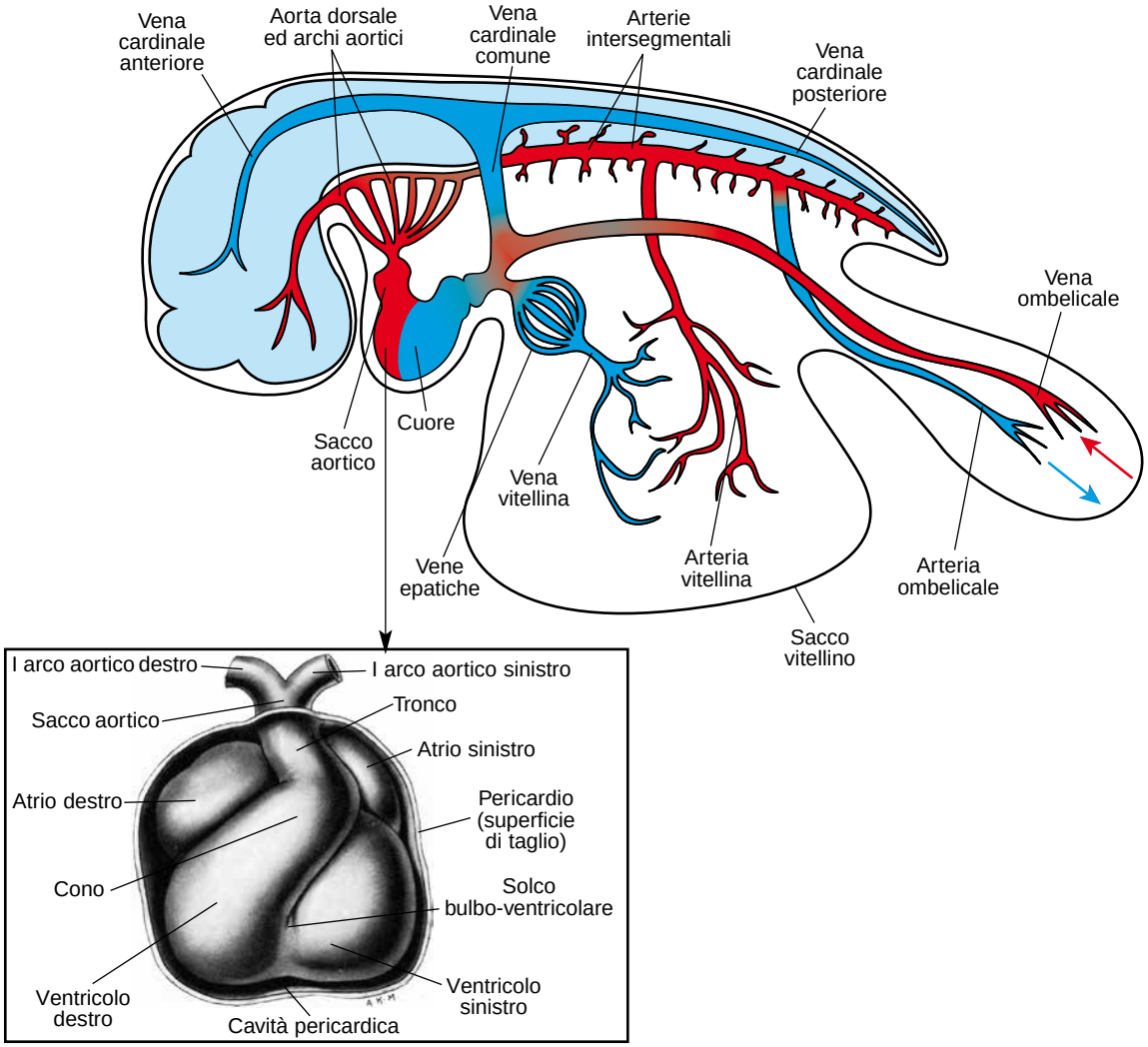



**Figura 17-13** ■ La circolazione del sangue intorno alla 4ª settimana. Nel riquadro è mostrato uno schema del cuore in questo periodo esposto a seguito dell'apertura della regione toracica e della cavità pericardica. (*Da* W.J. Hamilton, J.D. Boyd, H.W. Mossman, Embriologia Umana, Piccin Nuova Libraria, Padova, 1977).

- il **corno destro** viene incorporato nell'atrio destro e forma la parete dell'atrio destro internamente liscia (**sinus venarum**). In questa regione sboccano la **vena cava superiore** (vedi sotto) e la **vena cava inferiore.** Quest'ultima si forma dalla fusione di quattro residui di vasi venosi che dall'alto al basso sono: vena vitellina di destra, vena sottocardinale di destra, vena sopracardinale di destra e vene cardinali posteriori destra e sinistra;
- il **corno sinistro** regredisce e diventa la **vena obliqua di Marshall** dell'atrio sinistro e il **seno coronario** che raccoglie il sangue venoso della regione posteriore del cuore. Quest'ultimo viene trascinato a destra e sbocca nella regione del sinus venarum dell'atrio destro in corrispondenza della valvola senoatriale destra, una porzione della quale diventa la valvola del seno coronario;
- le **vene cardinali**. La vena cardinale anteriore destra dà origine alla vena brachiocefalica destra e, insieme alla vena cardinale comune destra, alla **vena cava superiore** che sbocca nel sinus venarum (Fig. 17-27 e Tab. 17-2); la vena cardinale anteriore sinistra si anastomizza con quella di destra (vena brachiocefalica sinistra) e poi regredisce formando insieme al tratto prossimale della cardinale posteriore sinistra, la vena intercostale superiore sinistra; la vena comune cardinale sinistra segue il destino del corno sinistro e regredisce. Le vene cardinali posteriori danno origine principalmente ai vasi del mesonefro e scompaiono quasi totalmente quando questo regredisce, gli unici residui sono le radici delle vene azygos e delle vene iliache comuni;
- le **vene vitelline**. Il tratto della **vena vitellina di destra** tra il fegato e il cuore diventa il tratto terminale

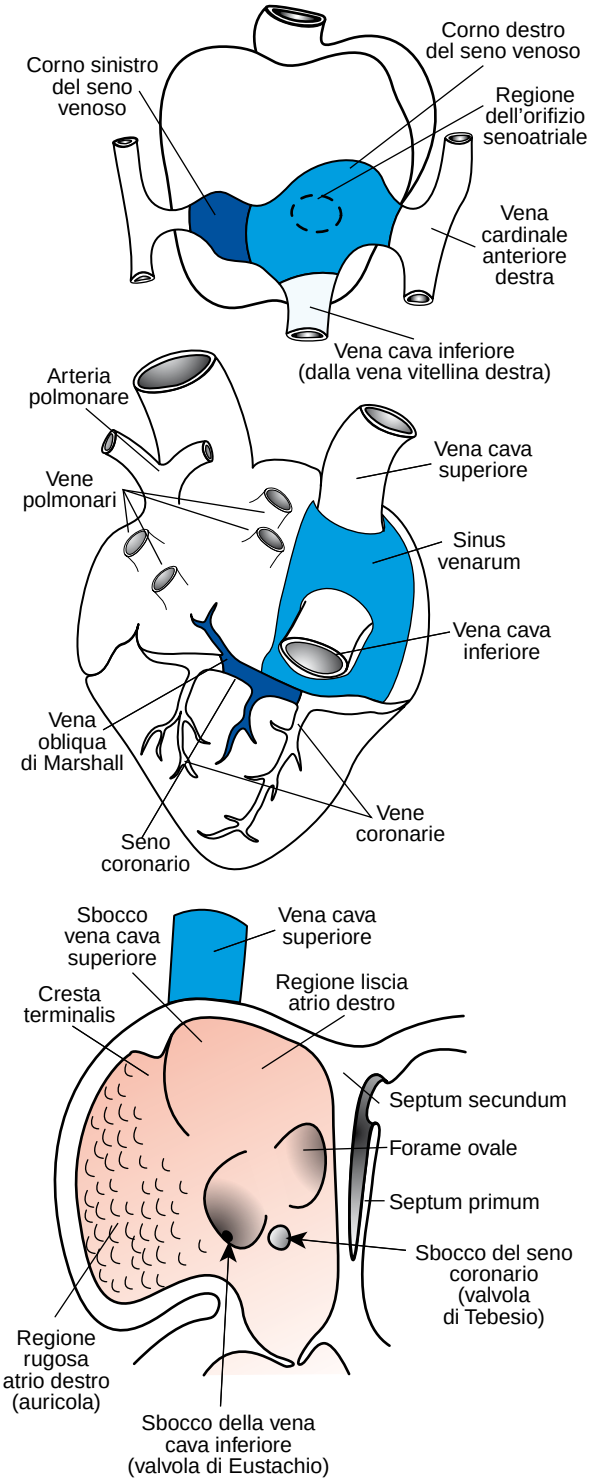



**Figura 17-14** ■ Evoluzione del seno venoso nella regione posteriore del cuore destro. Il corno destro viene incorporato nell'atrio di destra. Internamente (in basso) forma la regione del sinus venarum dell'atrio di destra; il corno sinistro regredisce e da origine al seno coronario e alla vena obliqua di Marshall.

della **vena cava inferiore**. Questa sbocca nel sinus venarum dove acquista una valvola (valvola di Eustachio) a spese di una parte della valvola senoatriale di sinistra; il tratto corrispondente della vena vitellina di sinistra regredisce e scompare;

- le **vene ombelicali**. Il segmento prossimale della vena ombelicale di sinistra regredisce, quello distale permane nel cordone ombelicale e, penetrato nell'embrione, si getta nel dotto venoso a livello del fegato; la vena ombelicale di destra regredisce.

## Cambiamenti negli atri

### Atrio destro definitivo

Con l'incorporazione del corno destro del seno venoso nell'atrio primitivo di destra, questo può essere ora chiamato atrio destro definitivo e risulta formato da due regioni, una internamente liscia (sinus venarum) in cui si aprono la vena cava inferiore e superiore e il seno coronario, e una internamente rugosa e trabecolata comprendente anche una tasca muscolare conica detta **auricola destra** che deriva dall'atrio destro primitivo. Il confine fra queste due regioni è segnato internamente dalla **crista terminalis** ed esternamente dal **sulcus terminalis**. Le valvole destra e sinistra del seno coronario prima si fondono al di sopra dell'orificio senoatriale formando un setto transitorio chiamato **septum spurium**, poi quella di sinistra entra a far parte del septum secundum che divide gli atri destro e sinistro, mentre quella di destra forma la valvola del seno coronario e della vena cava inferiore (Fig. 17-14).

### Atrio sinistro definitivo

All'inizio della 4ª settimana dall'atrio sinistro primitivo origina un'estroflessione, l'abbozzo di una vena polmonare. Questa si biforca dando origine a due rami che a loro volta si biforcano formando le quattro **vene polmonari**. Durante la 5ª settimana il tronco e le prime due ramificazioni delle vene polmonari vengono incorporate nella parete posteriore dell'atrio sinistro, dove formano la **regione liscia** dell'atrio sinistro definitivo. Alla fine le quattro vene polmonari sboccano nell'atrio sinistro attraverso quattro aperture. Il resto dell'atrio sinistro è trabecolato e comprende l'**auricola sinistra** (Fig. 17-15).

### Suddivisione degli atri e del canale atrioventricolare

Alla fine della 4ª settimana inizia la separazione degli atri. Un setto di tessuto sottile a forma di semiluna il **septum primum** emerge dal tetto degli atri e cresce verso il basso in direzione del canale atrioventricolare. Il setto non separa completamente gli atri che rimangono in comunicazione mediante una piccola apertura l'**ostium primum** (Fig. 17-16A). Nel frattempo, quattro rigonfiamenti di cellule mesenchimali (**cuscinetti endocardici**) si sviluppano al disotto dell'endocardio lungo il contorno del canale atrioventricolare. I cuscinetti superiore e inferiore si fondono formando il **septum intermedium** che divide il canale atrioventricolare in due canali, **canale atrioventricolare destro** e **sinistro** (Figg. 17-16 e 17-17); questa duplicazione del canale è accompagnata da uno spostamento della regione sinistra verso destra che descriveremo più avanti e che

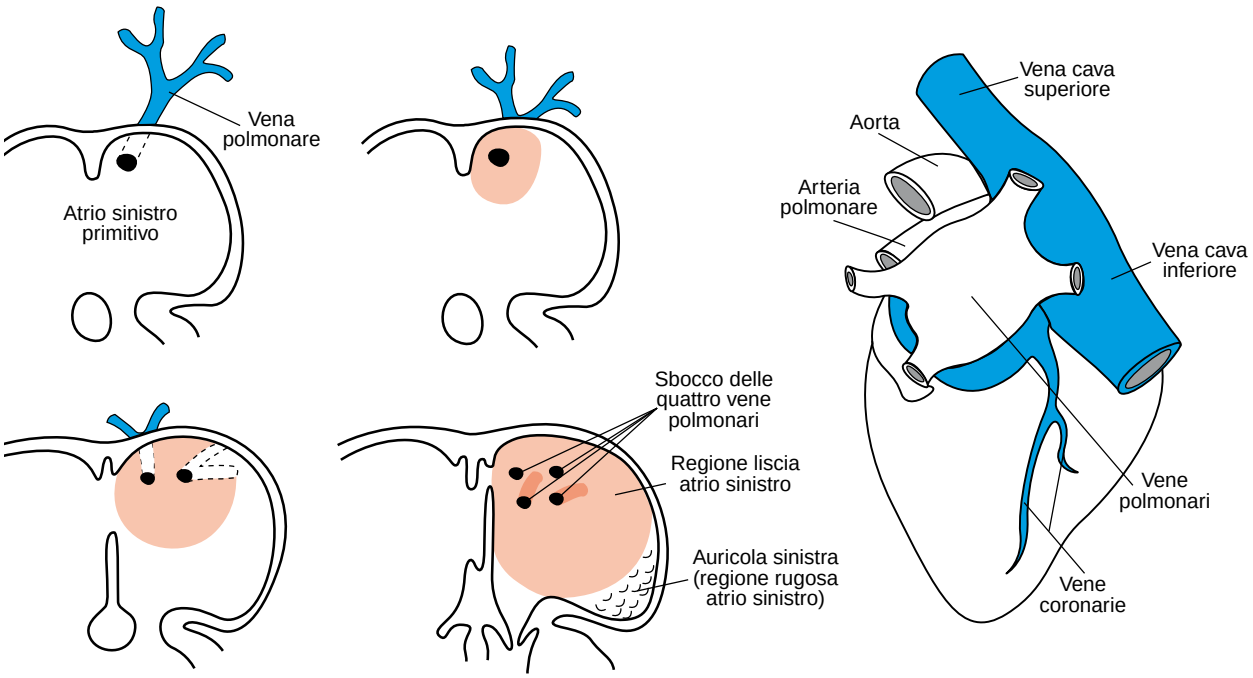



**FIGURA 17-15** ■ A sinistra visione interna della formazione dell'atrio sinistro definitivo con la formazione del tronco delle quatto vene polmonari. L'area in rosso è la regione liscia dell'atrio formatesi con l'incorporazione del tronco polmonare nell'atrio sinistro primitivo. A destra visione posteriore del cuore con le quattro vene polmonari dell'atrio di sinistra.

ha lo scopo di allineare il canale atrioventricolare destro con il ventricolo di destra e il canale atrioventricolare sinistro con il ventricolo sinistro.

Alla fine della 6ª settimana il septum primum si fonde con il septum intermedium e questo processo porta alla progressiva chiusura dell'ostium primum (Fig. 17-16B). Tuttavia, poiché a questo stadio di sviluppo dai polmoni ancora poco sviluppati giunge all'atrio sinistro una quantità irrisoria di sangue, per consentire all'atrio, e quindi al ventricolo sinistro, di continuare a ricevere un adeguato apporto sanguigno, prima che l'ostium primum si chiuda completamente, sul margine superiore del septum primum compaiono dei piccoli fori multipli, che poi confluiscono per formare una nuova ampia apertura, l'**ostium secundum**. Contemporaneamente, mentre il septum primum sta crescendo, subito alla sua destra nasce dal tetto dell'atrio destro una seconda cresta a forma di semiluna: si tratta del **septum secundum**. Questo, spesso e di struttura muscolare, cresce verso il septum intermedium, ma non lo raggiunge, lasciando un'apertura presso il pavimento dell'atrio chiamata **forame ovale** o **di Botallo** (Fig. 17-16C). Per tutta la durata della gravidanza, l'atrio destro comunica così con il sinistro mediante due aperture sfalsate: l'ostium secundum presso il tetto dell'atrio sinistro e il forame ovale presso il pavimento dell'atrio destro. Il residuo del septum pri-

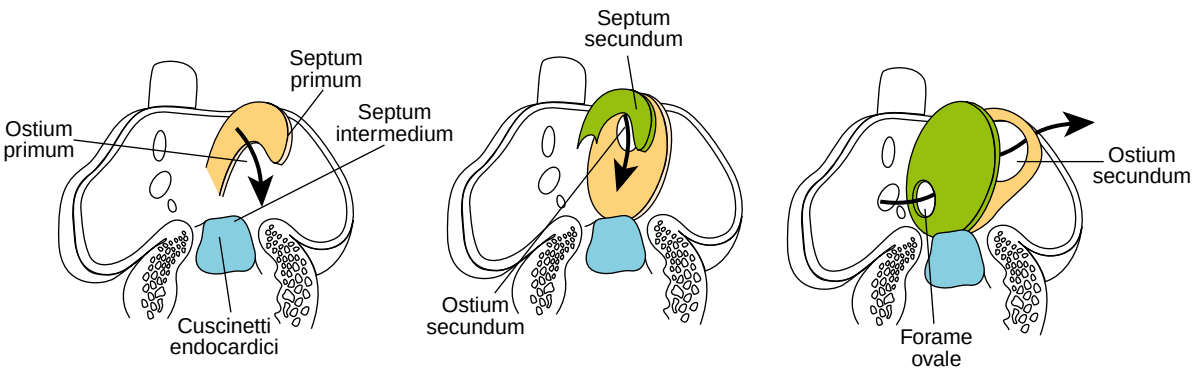



**FIGURA 17-16** ■ Formazione dei setti interatriali, del forame ovale e dell'ostium secundum.

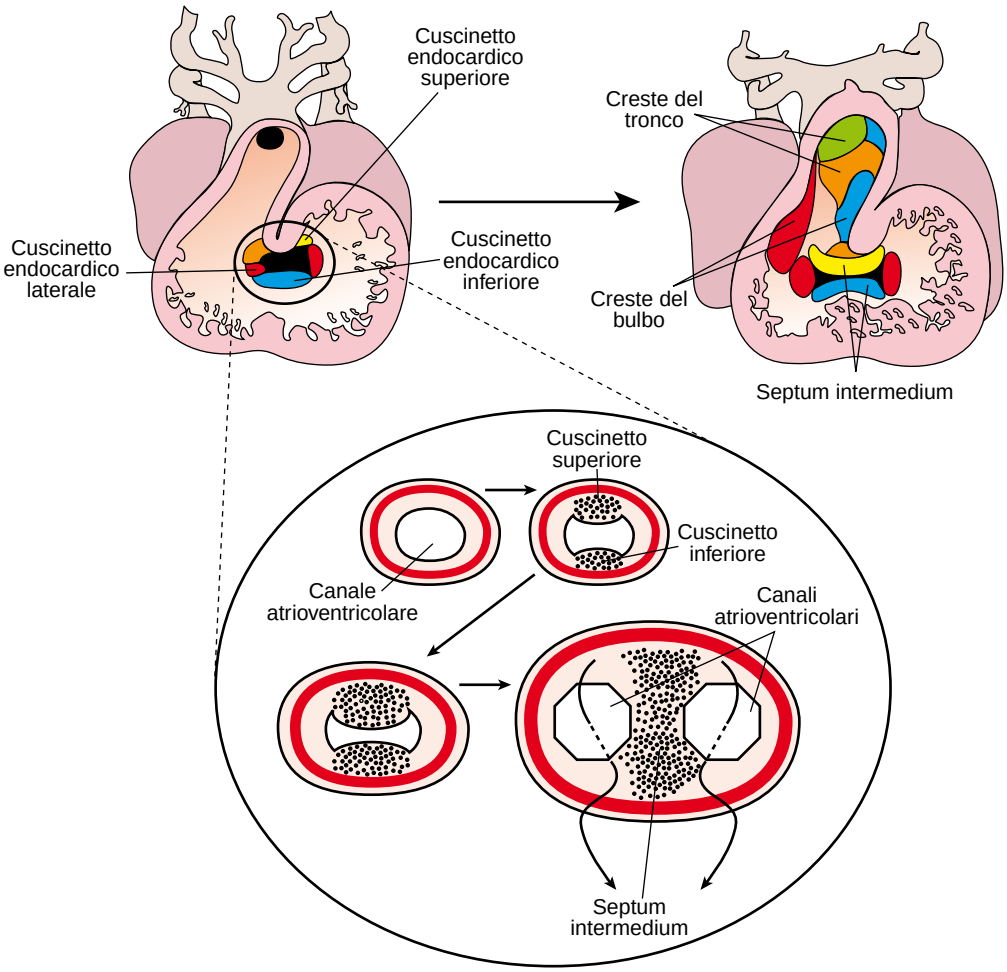



**Figura 17-17** ■ In alto vista ventrale della suddivisione del canale atrio-ventricolare. Nel riquadro schema della separazione con la fusione dei cuscinetti endocardici superiore ed inferiore vista dell'alto.

mum e il septum secundum agiscono come **valvola del forame ovale**, che consente il passaggio di sangue dall'atrio destro al sinistro.

## Ventricolo destro e sinistro definitivi e loro sepimentazione

La definizione morfologica dei ventricoli e la loro separazione avviene nella 4ª e 5ª settimana. Il ventricolo destro definitivo origina dal segmento ventricolare del bulbo e dalla parete di destra del cono, il ventricolo sinistro definitivo dal ventricolo primitivo e dalla parete sinistra del cono. Il modellamento di queste regioni è accompagnato dallo sviluppo di trabecole sulla superficie luminale che occupano gran parte della cavità dei ventricoli. Alcune trabecole rimangono a costituire le **trabecole carnee**, altre si trasformano nei **muscoli papillari** e nelle **corde tendinee** che connettono la parete del ventricolo alle valvole atrioventricolari. L'espansione dei due ventricoli porta all'avvicinamento e alla graduale fusione delle loro pareti mediali nonché alla formazione di un **setto muscolare interventricolare** o **ventricolare** a livello del canale interventricolare. Il setto inizialmente non separa completamente i ventricoli che rimangono in comunicazione in corrispondenza di una piccola apertura chiamata **forame interventricolare**. Alla fine della 5ª settimana, avviene la chiusura del forame a seguito della crescita di tre proliferazioni di cellule mesenchimali, due originatesi dalle creste del cono ed una dal cuscinetto endocardico inferiore del canale atrioventricolare; questa parte del setto interventricolare è chiamata **parte membranosa del setto ventricolare** (Fig. 17-18).

## Formazione del setto aortico-polmonare

Le due creste tissutali destinate a suddividere il segmento tronco-conico del bulbo (**creste del tronco**) incominciano a formarsi alla fine della 4ª settimana. Nella regione del tronco una delle creste è localizzata sul versante superiore destro della parete (**cresta superiore destra del tronco**), l'altra sull'opposto versante inferiore sinistro (**cresta inferiore sinistra del tronco**). Crescendo ra-

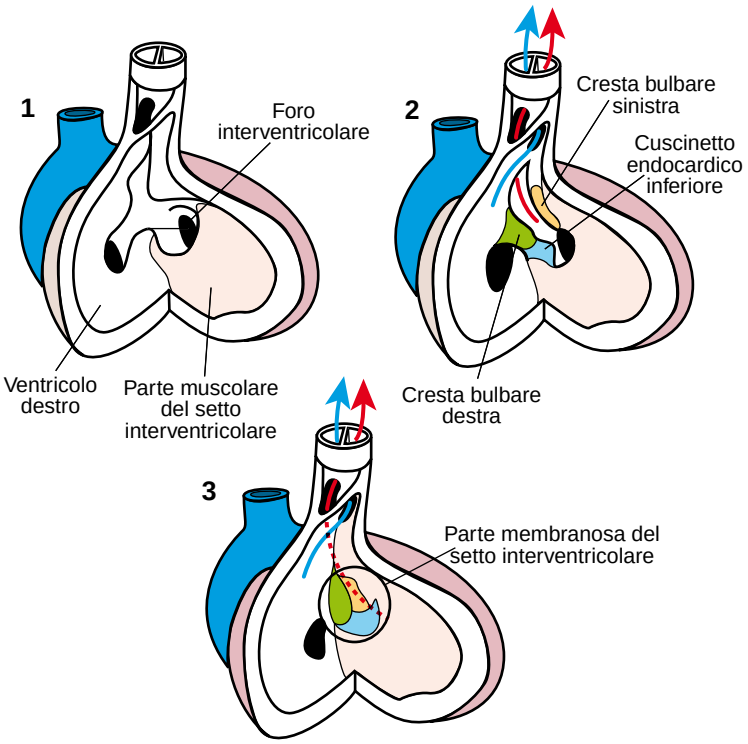



**FIGURA 17-18** ■ Tre fasi della sepimentazione dei ventricoli osservata in uno spaccato di cuore spostato a destra per meglio evidenziare il processo di sepimentazione; osservare le tre proliferazioni che portano alla formazione della parte membranosa del setto interventricolare.

pidamente le due creste si incontrano e si saldano in un **setto del tronco** che divide il canale in due metà corrispondenti al **primo tratto dell'aorta** e del **tronco polmonare**. Le creste del tronco si continuano in basso con due creste analoghe formatesi nella parete del cono del bulbo (**creste del bulbo**). Queste si fondono tra loro e con le creste del tronco in modo da formare un **setto spirale**, il **setto aortico-polmonare**, che separa completa-

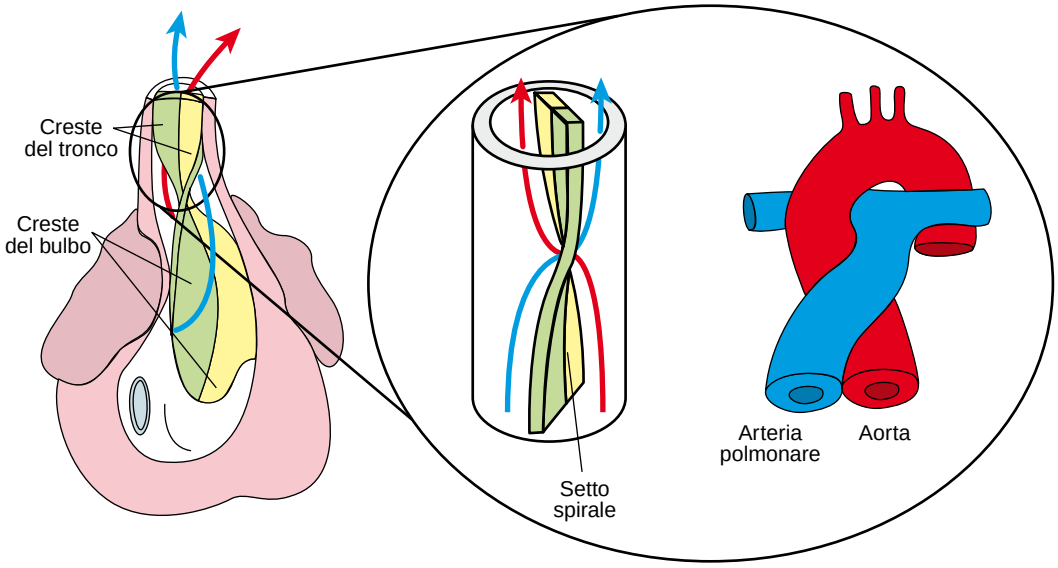



**FIGURA 17-19** ■ Formazione del setto aortico-polmonare, notare la forma a spirale che fa sì che all'uscita dal cuore l'aorta e la polmonare si intreccino.

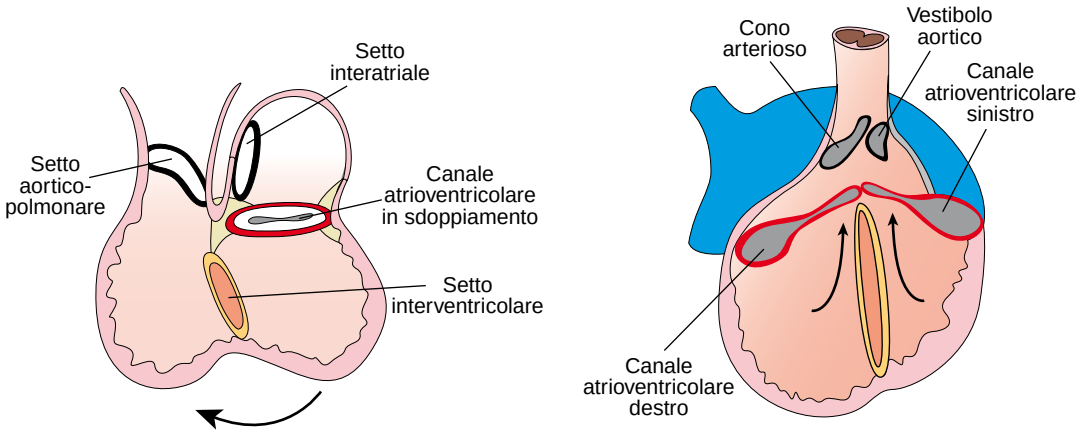



**Figura 17-20** ■ Spostamento della regione sinistra del cuore verso destra ed allineamento dei canali atrioventricolari con le regioni di efflusso dell'aorta (vestibolo aortico) e del tronco polmonare (cono arterioso).

mente queste regioni in due canali (Figg. 17-17 e 17-19). Questa regione bipartita del cono forma a livello del ventricolo destro definitivo il **cono arterioso** o **infundibolo**, da dove nasce l'arteria polmonare, e a livello del ventricolo sinistro definitivo il **vestibolo aortico**, da dove nasce l'aorta. Come descritto sopra, la separazione dei tratti di efflusso aortico e polmonare diventa completa quando il setto aortico-polmonare si fonde in basso con il cuscinetto endocardico inferiore del canale atrioventricolare. La forma a spirale del setto fa sì che l'aorta che all'inizio è situata posteriormente si ritrovi dopo un primo tratto in posizione anteriore; il contrario accade per il tronco polmonare.

## Rimodellamento della posizione degli atri e dei ventricoli

Mentre avvengono i processi descritti nei precedenti paragrafi, la regione sinistra del cuore si muove verso destra allo scopo di allineare il canale atrioventricolare destro con il ventricolo di destra e il canale atrioventricolare sinistro con il ventricolo sinistro. Allo stesso tempo questo spostamento porta il ventricolo sinistro ad allinearsi con la regione posteriore del tronco-cono dove si origina l'aorta. Al termine di questi movimenti, alla fine della 6ª settimana, gli atri sono allineati con i ventricoli e questi con i rispettivi tratti di efflusso dell'aorta (ventricolo sinistro con il vestibolo aortico) e dell'arteria polmonare (ventricolo destro con il cono arterioso) (Fig. 17-20).

## Sviluppo delle valvole cardiache

Nel cuore si sviluppano diversi sistemi di valvole. Nei paragrafi precedenti abbiamo visto lo sviluppo delle **valvole della vena cava inferiore** (anche detta di Eustachio) e **del seno coronario** (anche detta di Tebesio) nell'atrio destro a partire dalle valvole seno-atriali.

Nel canale atrio-ventricolare, dopo la sua suddivisione in destro e sinistro, si sviluppano le **valvole atrio-ventricolari**. Dopo la fusione dei cuscinetti endocardici che delimitano i canali atrioventricolari, ciascun orificio viene circondato da tessuto mesenchimale ricoperto da endocardio e, a contatto con trabecole, dal sottostante tessuto muscolare. Questo tessuto si assottiglia a causa del flusso sanguigno. Molte delle trabecole di tessuto connettivo degenerano, ma quelle che restano rimangono attaccate al mesenchima sovrastante delimitando dei lembi o cuspidi in questo tessuto, due a sinistra (**valvola bicuspide** o **mitrale**) e tre a destra (**valvola tricuspide**). I lembi rimangono collegati tramite sottili legamenti di tessuto connettivo (**corde tendinee**) ai **muscoli papillari** della parete interna dei ventricoli (Fig. 17-21).

All'origine dell'aorta e dell'arteria polmonare si formano le **valvole semilunari**. Gli abbozzi delle valvole semilunari si formano a seguito della proliferazione di cellule mesenchimali delle creste tronco-coniche nel tratto del cono arterioso e del vestibolo aortico. Durante la fusione delle creste, queste proliferazioni danno origine a tre tubercoli ricoperti dall'endocardio, che si assottigliano a causa del flusso di sangue e si modellano in tre lembi a nido di rondine con la concavità rivolta verso il vaso e la convessità verso il corrispondente ventricolo (Fig. 17-22). Questa morfologia ha il compito di permettere l'apertura delle valvole verso i vasi e di impedire il riflusso di sangue nei ventricoli.

## IL CUORE ALLA FINE DEL PERIODO EMBRIONALE

Alla fine del periodo embrionale, il cuore si trova in posizione quasi orizzontale all'interno della cavità pericardica; il fegato, che in questo momento ha un volume relativamente maggiore rispetto agli altri organi splancnici, si spinge nell'emiaddome di sinistra, spostando cranialmente il diaframma e il sovrastante apice del cuore. L'embrione ha ora una lunghezza CR di circa 3 cm, pesa 2 g e contiene all'incirca 200 µl di sangue. Il cuore, ancora di piccole dimensioni (circa 6 mm di lunghezza e 5 mm di

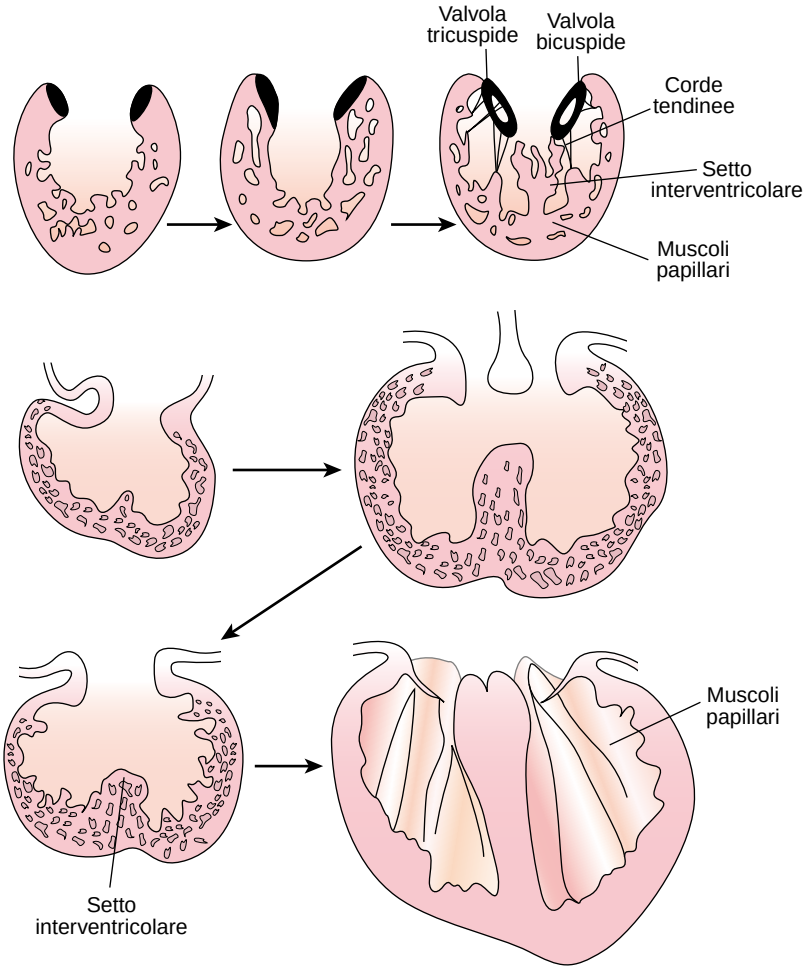



**Figura 17-21** ■ Formazione delle valvole atrioventricolari (in alto) e dei muscoli papillari dei ventricoli (al centro e in basso).

larghezza), ha raggiunto una morfologia pressoché definitiva. Si contrae intorno ai 140 battiti al minuto immettendo nell'aorta circa 80 µl di sangue ad ogni contrazione.

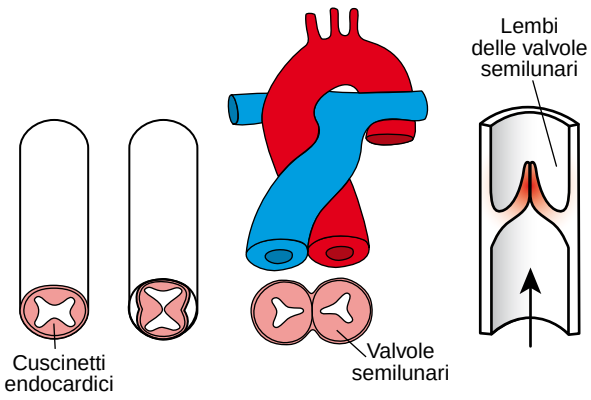



**Figura 17-22** ■ Formazione delle valvole semilunari dell'aorta e del tronco polmonare; notare la forma a nidi di rondine con la concavità rivolta verso il vaso e la convessità verso il ventricolo.

Possiede quattro camere e un sistema di afflusso (vena cava superiore ed inferiore) ed uno di efflusso (aorta e tronco polmonare) del sangue controllati da valvole in via di completamento (Figg. 17-22, 17-23 e 17-24). Anche se le sue dimensioni cresceranno in funzione della crescita del feto, la struttura rimarrà pressoché invariata durante il periodo fetale. L'atrio destro riceve i ritorni venosi sistemici (vena cava inferiore e superiore) e il seno coronario. Il setto interatriale mostra un'ampia soluzione di discontinuità, l'ostium secundum e il forame ovale, delimitata da un lembo mobile con funzione valvolare, che si introflette nell'atrio sinistro. L'atrio sinistro riceve uno scarso ritorno venoso polmonare (si ricordi che i polmoni non sono ancora funzionanti), attraverso le quattro vene polmonari. Il ventricolo destro è caratterizzato da una grossolana trabecolatura muscolare, soprattutto in corrispondenza dell'apice e ha una forma triangolare. La valvola atrioventricolare destra ha un impianto più basso rispetto alla mitrale ed ha tre lembi (tricuspide) che si inseriscono su più muscoli papillari. Il ventricolo sinistro presenta una forma allungata, conica, ed internamente una fine trabecolatura. La valvola atrioventricolare sinistra (mitrale), bicuspide, è in conti-

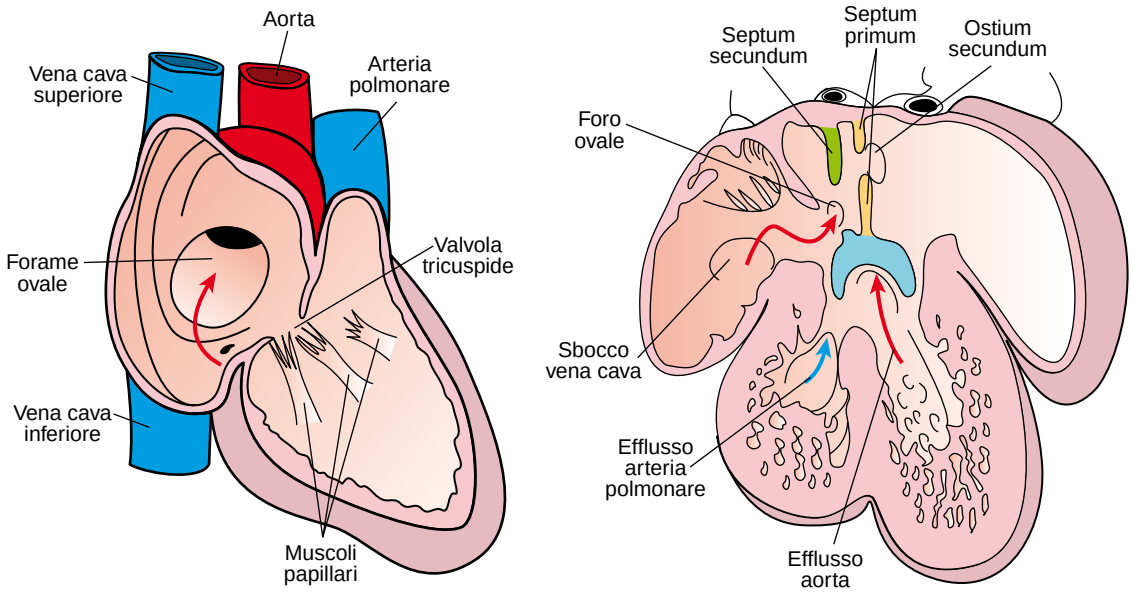



**Figura 17-23** ■ Il cuore alla fine del periodo embrionale. A sinistra spaccato della regione destra. A destra sezione mediale delle quattro cavità con setti e valvole.

nuità fibrosa con la radice aortica. I due lembi della valvola atrioventricolare (anteriore e posteriore) sono connessi a due distinti muscoli papillari, o gruppi di muscoli, uno antero-laterale ed uno postero-mediale. L'arteria polmonare che nasce dal ventricolo destro ha un decorso antero-posteriore, quasi orizzontale. Dopo aver in-

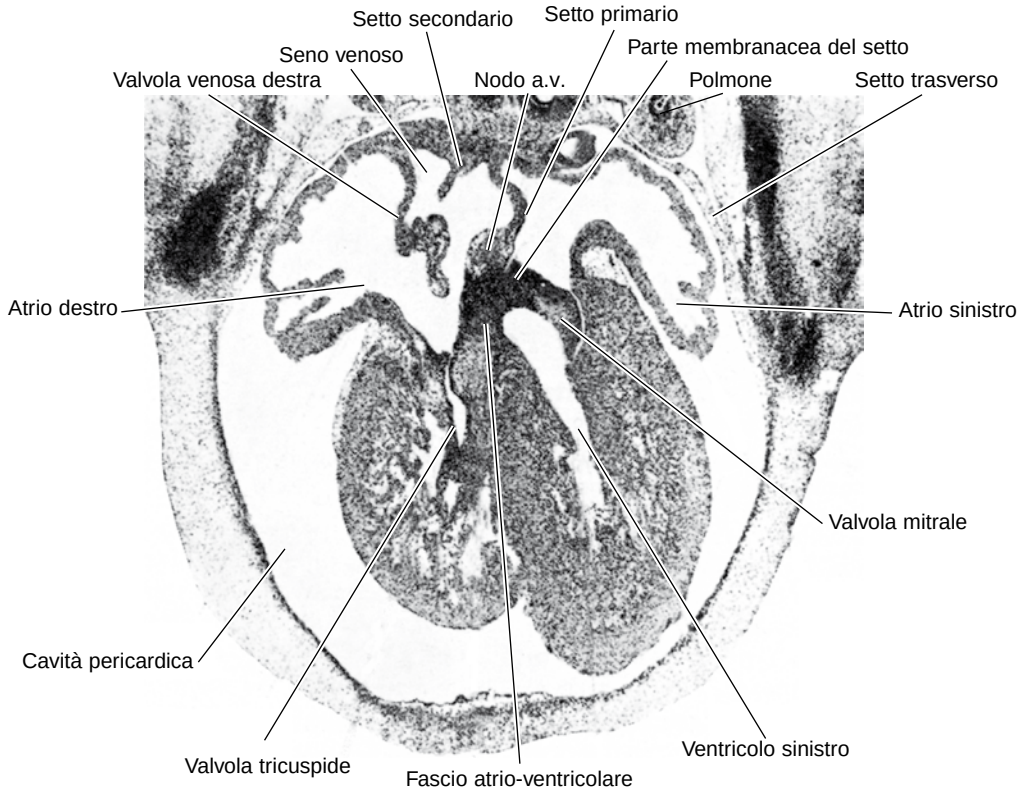



**Figura 17-24** ■ Sezione di cuore di un embrione di circa sette settimane. (*Da* W.J. Hamilton, J.D. Boyd, H.W. Mossman, Embriologia Umana, Piccin Nuova Libraria, Padova, 1977.)

crociato l'aorta anteriormente dà origine alle due arterie polmonari destra e sinistra, che nel feto presentano un calibro molto ridotto, e al dotto arterioso di Botallo. L'aorta, che nasce dal ventricolo sinistro, decorre posteriormente e verso l'alto, dando origine a livello dell'arco ai rami delle arterie brachiocefaliche.

Il cuore fetale si differenzia strutturalmente dal cuore postnatale per la presenza di un'ampia comunicazione interatriale e per il dotto arterioso di Botallo. La comunicazione tra gli atri è assicurata dalla presenza del **forame ovale di Botallo** e dell'**ostium secundum** e permette al sangue proveniente dalla vena cava inferiore ricco di ossigeno di portarsi direttamente nell'atrio sinistro e poi dal ventricolo sinistro nel grande circolo, eludendo la circolazione polmonare. Una seconda deviazione, il **dotto arterioso di Botallo** è uno *shunt* (un cortocircuito) che mette in comunicazione il tronco polmonare e l'aorta discendente. Esso ha la duplice funzione di deviare nell'aorta tutto il sangue che il circolo polmonare non è ancora in grado di ricevere e al tempo stesso di consentire al ventricolo destro di "esercitarsi" in vista dei cambiamenti circolatori postnatali (vedi paragrafi seguenti e Fig. 17-28).

## CENNI SULLO SVILUPPO DEL SISTEMA ARTERIOSO E VENOSO

Lo sviluppo della rete di vasi che costituiscono il sistema arterioso e venoso è complesso e la sua conoscenza dettagliata non è necessaria per la preparazione di base dello studente di medicina. Pertanto riassumeremo solo brevemente ed in modo schematico lo sviluppo dei principali vasi dei due sistemi.

### Il sistema arterioso

Come visto nei paragrafi precedenti (Fig. 17-13) il sistema arterioso primitivo dell'embrione è formato da due **aorte dorsali**, due **arterie ombelicali** e due **arterie vitelline** (Fig. 17-25). Dalle aorte dorsali si ramificano una trentina di **arterie intersegmentali** che vanno ad irrorare i somiti ed i loro derivati. Quando tra la 4ª e la 5ª settimana nella regione del collo si formano gli archi faringei, essi vengono irrorati da sei paia di arterie chiamate **archi aortici** (Fig. 17-26) i cui derivati sono riportati nella Tabella 17-1. Gli archi aortici si formano dal sacco aortico dell'abbozzo cardiaco e si gettano nell'aorta dorsale, originatasi dalla fusione delle primitive due aorte dorsali. Mentre alcune arterie intersegmentali o parte dei loro tratti degenerano, altre si trasformano in arterie del collo, del tronco e del bacino. Le arterie ombelicali sono rami ventrali delle aorte dorsali che attraverso il peduncolo embrionale prima e poi il cordone ombelicale trasportano sangue poco ossigenato alla placenta (Fig. 17-25). Le parti prossimali (superiori) delle arterie ombelicali diventano le arterie iliache interne e le arterie vescicali superiori, mentre le parti distali (posteriori) si obliterano e dopo la nascita contribuiscono alla formazione del legamento ombelicale mediano che origina dall'uraco. Le arterie vitelline che irrorano il sacco vitellino danno origine all'arteria mesenterica superiore.

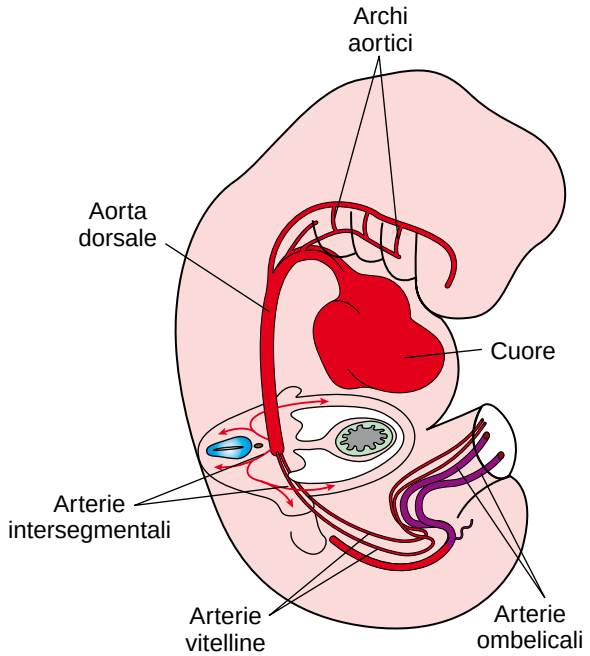



**Figura 17-25** ■ Sistema arterioso primitivo di un embrione. A livello del cordone ombelicale è mostrata una sezione trasversale.

**TABELLA 17-1**
Derivati degli archi aortici e del sistema arterioso primitivo

| | |
|---|---|
| I arco | Regressione quasi completa, residui incorporati nelle arterie mascellari |
| II arco | Regressione quasi completa, residui forse incorporati nelle arterie stapedie |
| III arco | Arterie carotidi comuni e carotidi interne |
| IV arco destro | Parte succlavia destra |
| IV arco sinistro | Parte arco aortico |
| V arco | Si abbozza e regredisce o non si forma affatto |
| VI arco destro | Parte prossimale arteria polmonare |
| VI arco sinistro | Dotto arterioso (alla nascita regredisce e diventa il legamento arterioso) |
| Aorte dorsali | La ventrale regredisce; la dorsale da origine alle arterie intersegmentali da cui origineranno i vasi che irrorano tutti i derivati dei somiti |
| Arterie ombelicali | Arterie iliache interne, e arterie vescicali superiori |
| Arterie vitelline | Arterie della regione gastro-intestinale |

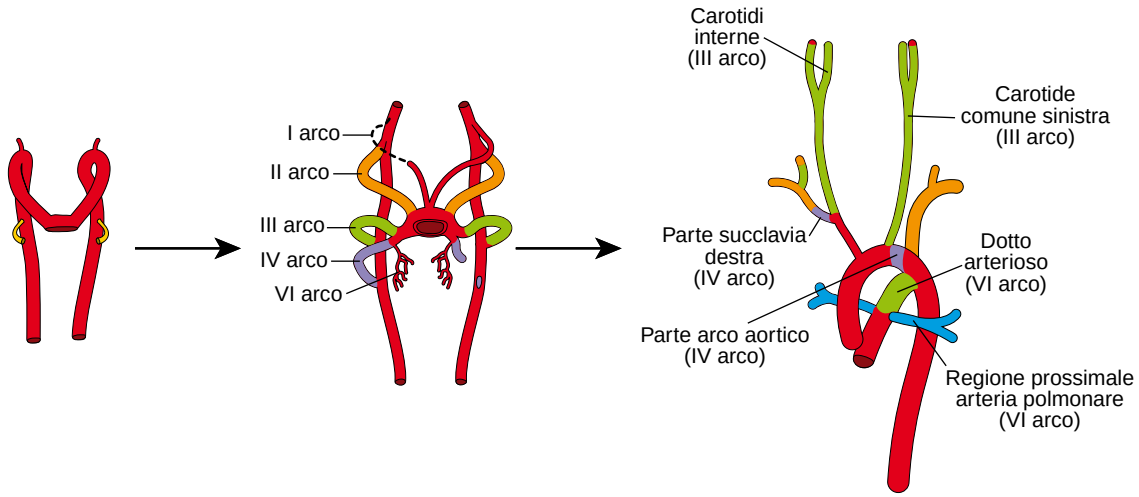



**Figura 17-26** ■ Gli archi aortici e i loro derivati.

## Il sistema venoso

Inizialmente il sistema venoso dell'embrione è formato dalle **vene cardinali** e dalle **vene vitelline** e **ombelicali** (Fig. 17-27A). Dell'evoluzione delle vene cardinali e dei tratti delle vene vitelline ed ombelicali prossimali al seno venoso del cuore abbiamo trattato nei paragrafi precedenti. Nella Tabella 17-2 sono riportati i principali derivati prossimali e distali delle vene cardinali, vitelline ed ombelicali. Nel periodo che va dalla 5ª alla 7ª settimana, nell'embrione si forma un nuovo sistema venoso che prima si sovrappone e poi sostituisce il sistema delle vene cardinali. Si tratta delle **vene sottocardinali**, **sacrocardinali** e **sopracardinali** che daranno origine al sistema venoso definitivo, il cui complesso sviluppo non verrà trattato in questo testo (Fig. 17-27B).

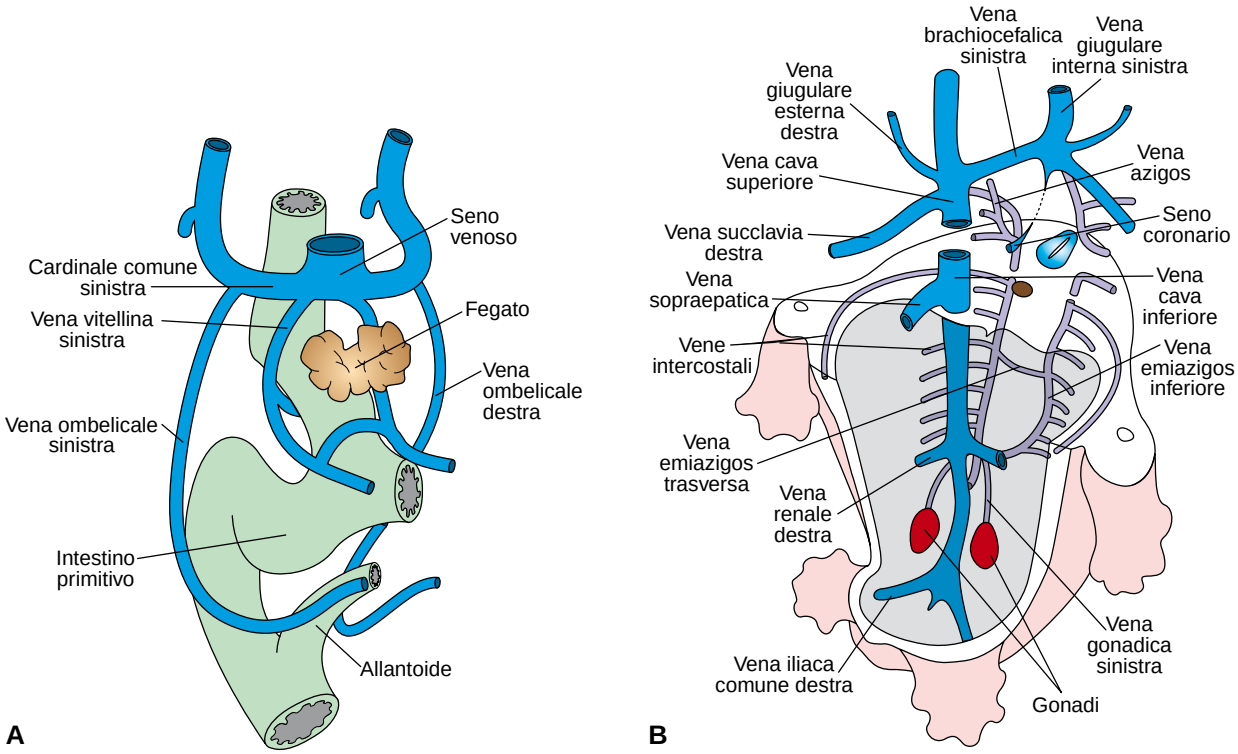



**Figura 17-27** ■ *A*) Sistema venoso primitivo di un embrione e (*B*) sua evoluzione finale.

**TABELLA 17-2**
Il sistema venoso primitivo e suoi derivati

| | |
|---|---|
| Vena cardinale anteriore destra | Parte vena cava superiore, giugulare interna destra |
| Vena cardinale anteriore sinistra | Giugulare interna sinistra |
| Vena cardinale comune destra | Parte vena cava superiore |
| Vena cardinale comune sinistra | Seno venoso coronario |
| Vena cardinale posteriore destra<br>Vena cardinale posteriore sinistra | Irrorano il mesonefro e poi regrediscono con esso, i residui vengono incorporati nelle vene azygos e nelle vene iliache comuni |
| Vena vitellina destra | Parte prossimale vena cava inferiore, vene epatiche, vena mesenterica superiore |
| Vena vitellina sinistra | Regredisce |
| Dall'anastomosi delle due vene vitelline | Vena porta, vena splenica, vene mesenteriche |
| Vena ombelicale destra | Degenera |
| Vena ombelicale sinistra | Il segmento distale permane fino alla nascita |

## LA CIRCOLAZIONE SANGUIGNA DURANTE IL PERIODO FETALE

Nel periodo fetale la circolazione sanguigna presenta numerose differenze funzionali e strutturali rispetto alla vita postnatale, legate principalmente alla non-funzionalità dei polmoni e alla presenza della placenta (Fig. 17-28). In particolare, il sangue ossigenato proveniente dalla placenta tramite la **vena ombelicale sinistra**, solo in piccola parte attraversa il fegato percorrendo i sinusoidi epatici per poi refluire alla vena cava inferiore: la maggior parte, utilizzando lo *shunt* costituito dal **dotto venoso** (di Aranzio), si getta invece direttamente nella **vena cava inferiore** per poi raggiungere l'atrio destro.

Oltre al sangue ben ossigenato proveniente dalla vena cava inferiore, all'atrio destro giunge anche, attraverso la vena cava superiore, un'altra corrente di sangue, meno ossigenato perché refluo da collo, testa e arti superiori. I due flussi formano due correnti emodinamicamente separate, che si mescolano solo in minima parte nell'atrio e prendono direzioni diverse. Il flusso cavale inferiore, ben ossigenato, viene convogliato verso il forame ovale e l'ostium secundum nell'atrio sinistro. Da qui raggiunge il ventricolo sinistro, l'aorta ascendente e l'arco aortico, da cui viene principalmente distribuito al collo, alla testa e agli arti superiori mediante i rami delle **arterie brachiocefaliche**. Soltanto una piccola frazione del sangue ben ossigenato del ventricolo sinistro (circa il 15%) viene indirizzato alla parte inferiore del corpo. Questa regione riceve invece dal ventricolo destro (tramite il tronco polmonare e il dotto arterioso di Botallo che, come si è detto, si apre nell'aorta discendente), principalmente la corrente del sangue meno ossigenato. Solo un 10% del sangue dell'atrio destro, attraverso il tronco polmonare, va nei polmoni non funzionanti. Infine sangue venoso ritorna alla placenta mediante le arterie ombelicali.

## PROCESSI E MOLECOLE

Nonostante molti dei geni che controllano la formazione del cuore siano stati identificati, la comprensione dei meccanismi cellulari e molecolari mediante i quali popolazioni cellulari cardiache così diverse e specializzate possano originare da precursori mesodermici e successivamente organizzarsi per formare distinte camere cardiache, arterie coronarie e grandi vasi, valvole e sistema di conduzione, rimane ancora ad uno stadio relativamente incompleto.

La formazione del cuore comincia con la precoce induzione di cellule cardiogeniche nel mesoderma embrionale, seguita dalla formazione dei campi cardiaci primari e secondari nella splancnopleura craniale; gli angioblasti derivati da queste regioni si organizzano quindi nei tubi cardiaci che prendono rapidamente contatto con i vasi sanguigni in via di formazione. Gli studi sui meccanismi coinvolti nella formazione del cuore e dei vasi sanguigni sono stati principalmente condotti su vari modelli animali in particolare negli uccelli e nei roditori; le informazioni riportate nei successivi paragrafi si riferiscono prevalentemente a questi modelli.

### *L'induzione cardiogenica*

Le cellule mesodermiche destinate a formare l'abbozzo del cuore, migrano attraverso l'estremità anteriore della linea primitiva all'inizio della gastrulazione, e si muovono lateralmente e in avanti, in stretta vicinanza con l'endoderma sottostante, formando una coppia (destra e sinistra) di **regioni formanti il cuore** (HFR, heart forming regions) nella splancnopleura craniale. Quando queste cellule raggiungono le pareti laterali dell'intestino faringeo, smettono di migrare e formano nell'ambito della splancnopleura sia a destra che a sinistra, i **campi cardiaci primari** e **secondari**. L'induzione e la a migrazione di queste cellule è controllata dall'endoderma dell'intestino

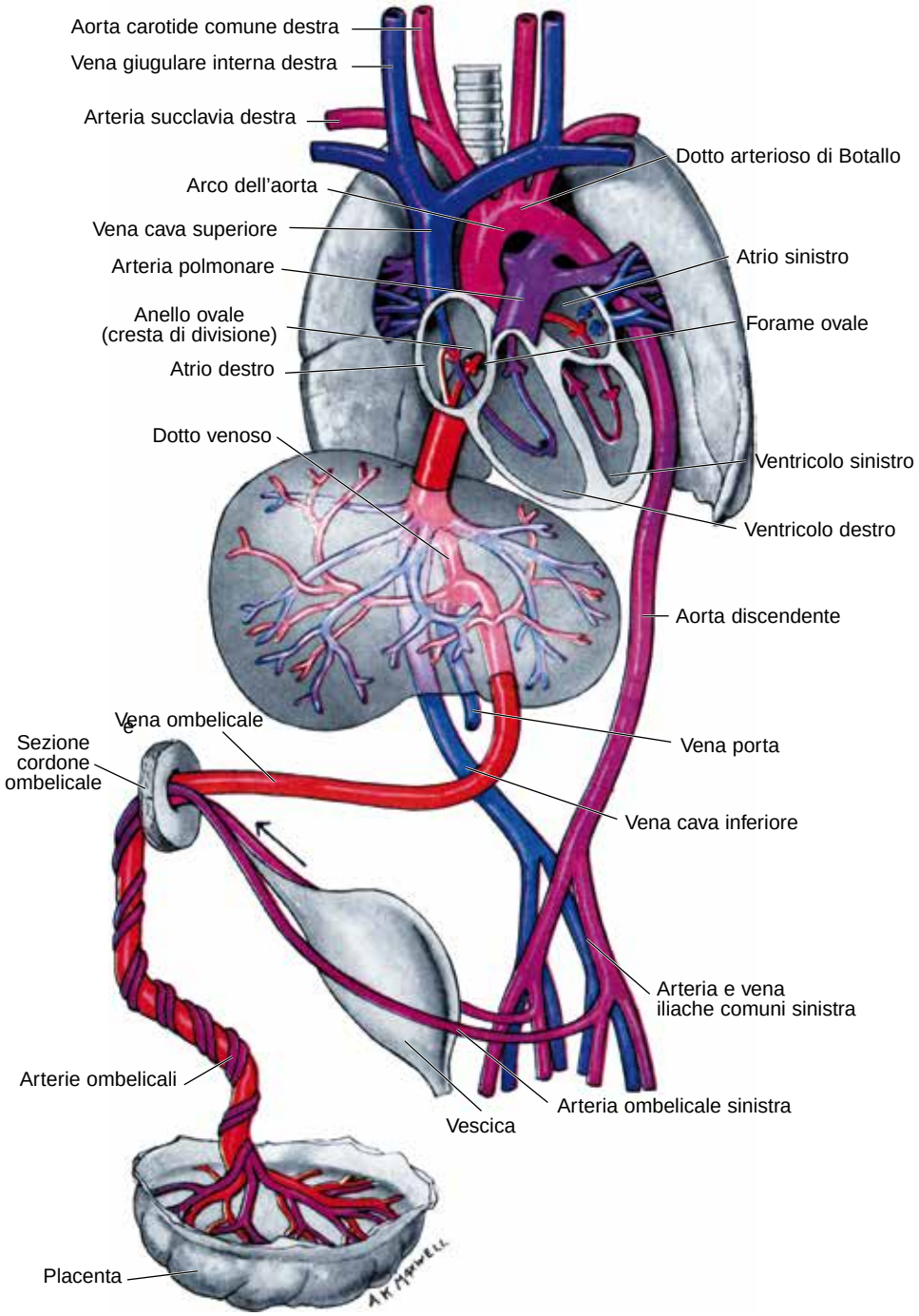



**Figura 17-28** ■ La circolazione sanguigna fetale. Il colore rosso dei vasi indica sangue ben ossigenato, viola mediamente ossigenato e blu poco ossigenato. (*Da* W.J. Hamilton, J.D. Boyd, H.W. Mossman, Embriologia Umana, Piccin Nuova Libraria, Padova, 1977.)

faringeo. Componenti della matrice extracellulare dell'endoderma, come la fibronectina, distribuita secondo un gradiente antero-posteriore, sembrano direzionare questa migrazione. In questa fase le cellule mesodermiche dei campi cardiaci esprimono N-caderina, che ne consente la reciproca adesione e l'organizzazione nell'epitelio splancnico. Una piccola porzione di queste cellule, perde successivamente l'espressione di N-caderina, lascia l'epitelio e da origine agli angioblasti che si organizzano nei **tubi endocardici primitivi**. Le cellule endoteliali dei tubi endocardici secernono quindi molecole che regolano il differenziamento del **mantello mioepicardico** (miocardio-epicardio) che si avvolge intorno ai tubi endocardici mentre essi si fondono e ruotano come descritto in precedenza.

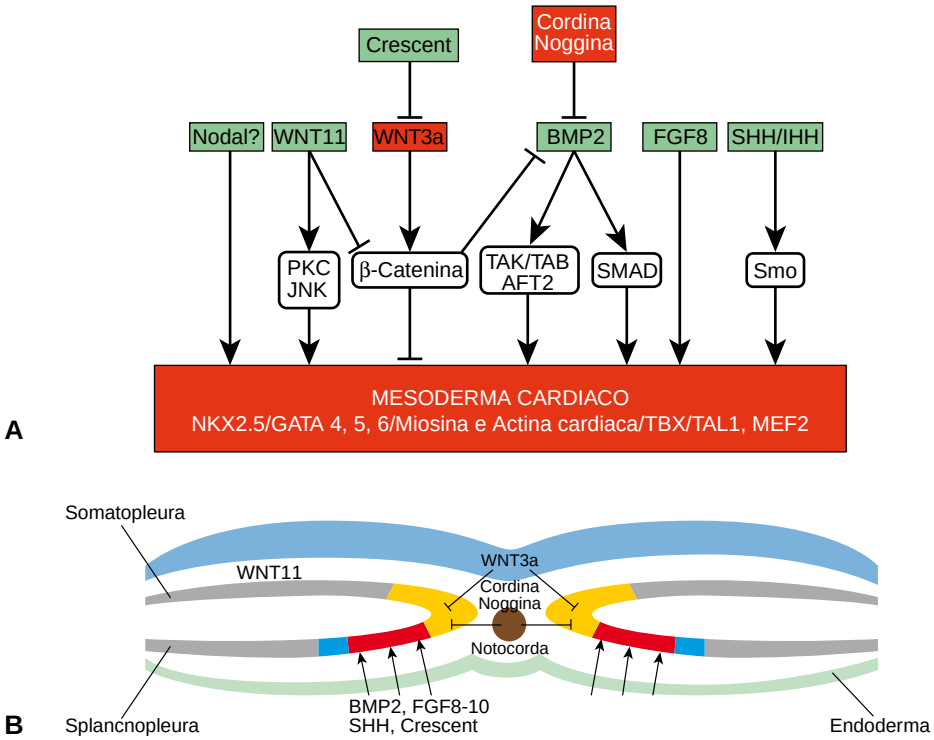



**Figura 17-29** ■ *A)* Schema dei principali fattori di crescita, vie di segnalazioni, fattori di trascrizione e proteine responsabili delle segnalazioni positive (in verde) e negative (in rosso) che inducono la splancnopleura cardiaca. *B)* Principali fattori di crescita coinvolti nella formazione dei tessuti cardiaci. In giallo, campo cardiaco secondario, in rosso-blu, campo cardiaco primario.

L'induzione degli angioblasti nel mesoderma splancnico si realizza attraverso una serie di segnali positivi e negativi (Fig. 17-29). I segnali positivi sono principalmente prodotti dall'endoderma e includono **BMP2** (bone morphogenetic protein 2), **FGF8** (fibroblast growth factor 8), **SHH** e **Crescent**; altri segnali positivi vengono prodotti dal limitrofo mesoderma somatico, come **WNT11** (wingless and int11). D'altra parte, segnali negativi o inibitori, come **Cordina**, **Noggina** e **WNT3a**, sono prodotti dal nodo di Hensen, dall'ectoderma, dalla notocorda e da cellule mesodermiche. L'insieme di questi segnali delimitano l'induzione di fattori di trascrizione, come **NKX2.5** (NKX transcription factor-related locus 2.5), **TAL1** (T-cell lymphocytic leukemia 1), **TBX1** (T box 1), **2**, **3** e **5**, ad una specifica popolazione di cellule mesodermiche, per l'appunto quella dei campi cardiaci. I precursori degli angioblasti sono caratterizzati dall'espressione dei fattori di trascrizione **NKX** contenenti omeodomini e fondamentali per il loro differenziamento in angioblasti; gli NKX inducono l'espressione di altri fattori trascrizionali, quali **MEF2** (myocyte enhancing factor 2) e di membri della famiglia **GATA** (globin transcription factor); l'azione coordinata di questi fattori induce quindi l'espressione di molte proteine cardiache specifiche tra le quali l'**actina** e la **miosina cardiaca**.

Tutti questi fattori inducono in tempi successivi la formazione sia dei **campi cardiaci primari** che dei **campi cardiaci secondari**. Per questi ultimi da ricordare il ruolo cruciale svolto dall'**FGF10**. La popolazione di cellule dei campi cardiaci primari va incontro ad un rapido differenziamento, come dimostrato dall'espressione di molte tipiche proteine cardiache già nei primi stadi di sviluppo; queste cellule formano i tubi endocardici primitivi destinati a formare le regioni di influsso di sangue nel cuore come il ventricolo sinistro, parte dell'atrio primitivo e il seno venoso. Questa popolazione di angioblasti contribuisce minimamente, se non per nulla, alle regioni di efflusso di sangue dal cuore costituite dal ventricolo destro, dal cono e dal tronco del ventricolo, che si formano in gran parte dagli angioblasti del campo cardiaco secondario (Fig. 17-30). Mentre gli angioblasti dei tubi endocardici primitivi sembrano in grado di differenziare soltanto in endotelio, quelli del campo cardiaco secondario possiedono una più ampia capacità di differenziamento che comprende oltre alle cellule endoteliali anche i cardiomiociti e altri tipi cellulari dei tessuti cardiaci (Fig. 17-31).

## *Controllo del ripiegamento del cuore e della specificazione delle camere cardiache*

Una fase critica nella formazione del cuore è la conversione dell'organizzazione cranio-caudale del tubo cardiaco lineare in un cuore primitivo con due atri e due ventricoli, posizionati secondo un orientamento sinistra-destra. Questa conversione inizia con il ripiegamen-

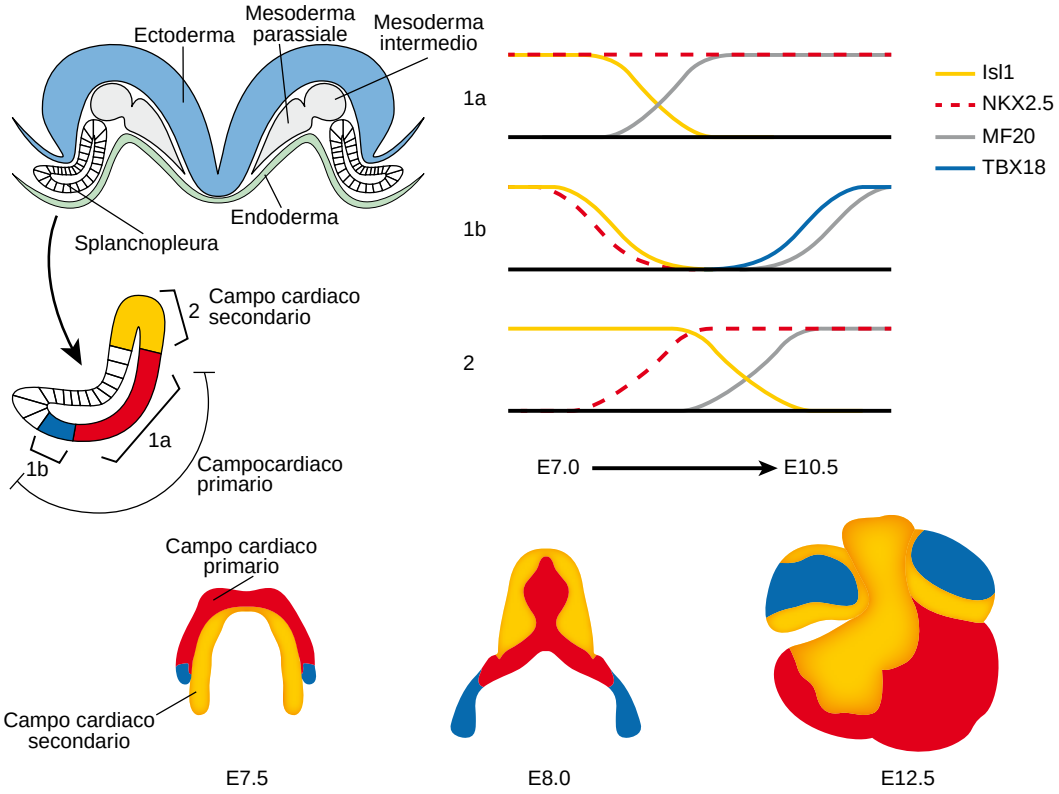



**Figura 17-30** ■ Schema della regionalizzazione della splancnopleura cardiaca nei campi cardiaci primario e secondario e delle regioni del cuore che ne derivano. Le curve a destra mostrano l'andamento tra 8 e 10 giorni di sviluppo embrionale nel topo (corrispondenti a circa 23°-28° giorno nell'uomo) dell'espressione di alcuni marcatori delle cellule del campo cardiaco primario (1a e 1b) e secondario (2): il gene per il fattore di crescita Isl1, i fattori di trascrizione NKX 2.5, e TBX18 e l'antigene MF20.

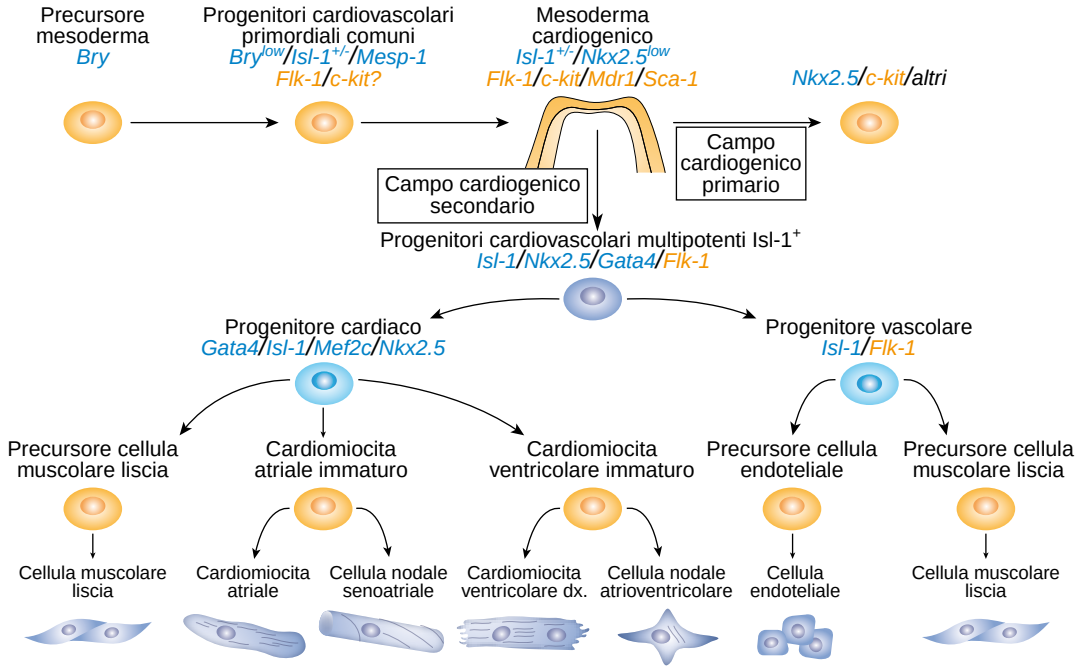



**Figura 17-31** ■ Linee differenziative dei tessuti cardiaci. Geni la cui espressione dirige il differenziamento delle diverse linee cellulari. Notare l'ampia capacità differenziativa degli angioblasti del campo cardiaco secondario (in grigio). In celeste, geni che codificano per fattori di trascrizione; in giallo, geni che codificano per proteine di membrana.

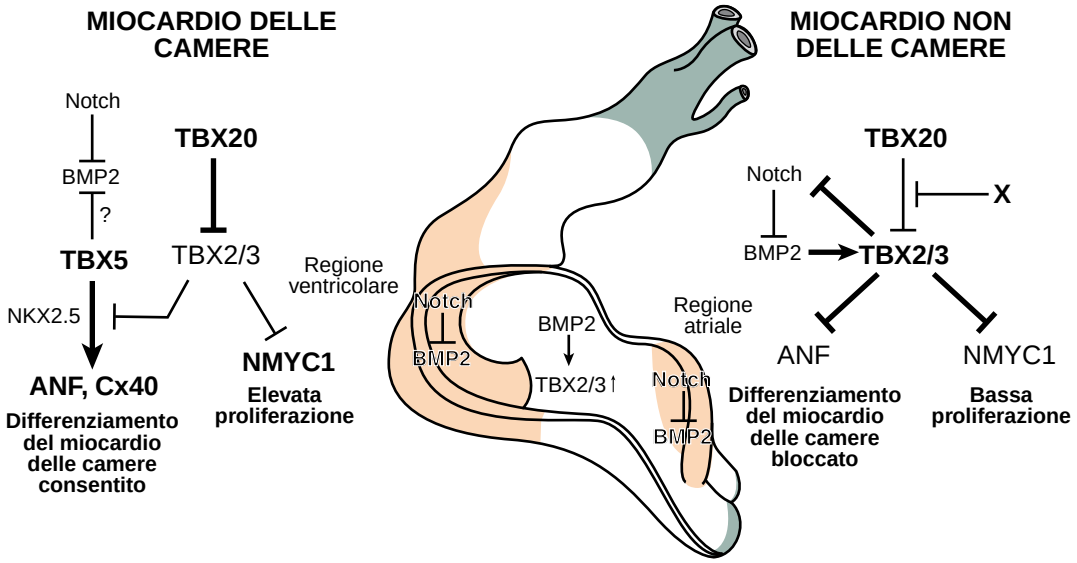



**Figura 17-32** ■ Vie di segnalazione e fattori trascrizionali coinvolti nella regolazione dello sviluppo delle camere cardiache. Il miocardio delle camere cardiache è mostrato in arancio. Nelle regioni delle camere cardiache, TBX20 inibisce TBX2/3, consentendo l'azione di TBX5 che, insieme a NKX2.5, inducono l'espressione dei geni specifici delle camere cardiache (*Anf*, *Cx40*)e di quelli della proliferazione (ad es., *Nmyc1*). Nelle regioni non delle camere, l'azione di TBX20 su TBX2/3 è inibita da un fattore sconosciuto (X) e TBX2/3 può inibire l'espressione dei geni specifici delle camere e di quelli proliferativi; l'espressione di TBX2/3 sarebbe indotta dal BMP2. Nelle regioni delle camere, Notch e probabilmente lo stesso TBX5 inibiscono l'azione di BMP2. Inoltre, nelle regioni al di fuori delle camere, l'espressione di TBX2/3 regolerebbe negativamente, con un meccanismo "feedback", l'azione inibitoria di Notch su BMP2 delineandone il confine.

to verso destra del tubo cardiaco guidato da un'asimmetria molecolare già presente all'interno del tubo cardiaco. In effetti, tale asimmetria viene imposta molto presto alle cellule del mesoderma laterale destro e sinistro dall'asimmetria presente nell'embrione stesso. Abbiamo visto nel Capitolo 10 che l'evento iniziale della formazione dell'asse destro/sinistro è regolato dalla differente espressione principalmente dei geni ***Nodal***, ***Lefty*** e ***Pitx2***. Perturbazioni dell'espressione di questi geni portano a ripiegamenti anormali del tubo cardiaco, dimostrando che lo sviluppo del cuore segue l'asimmetria definita dell'embrione. Altre proteine come **xin**, la cui espressione è attivata da NKX2.5 e MEF2, regolano invece le modificazioni del citoscheletro dei cardiomiociti, che sono necessarie per i ripiegamenti del tubo.

La specificazione del miocardio delle camere cardiache rispetto a quello delle altre regioni del cuore sembra essere determinata dall'espressione localizzata di specifiche combinazioni di fattori di trascrizione. In particolare, l'espressione di geni specifici dei cardiomiociti delle camere cardiache dipende dall'interazione tra **TBX5** e **NKX2.5**; nelle regioni che non devono diventare camere cardiache l'azione di TBX5 è inibita da **TBX2/3**. Recenti evidenze nel topo indicano che l'espressione localizzata di **BMP2**, regolata a sua volta dalla via di segnalazione di **Notch**, dirige in modo spazio-temporale l'espressione di TBX2/3 all'interno del tubo cardiaco (Fig. 17-32).

La specificazione funzionale dei ventricoli avviene con la formazione del **miocardio trabecolato**. Due vie di segnalazione principali sono coinvolte in questo processo, quella della **Neuregulina** (NRG) e quella dell'**acido retinoico** (RA); quest'ultima via è coinvolta anche nel ripiegamento verso destra del tubo cardiaco (Fig. 17-33). Il miocardio delle camere cardiache viene quindi specificato da segnali di posizione che determinano l'espressione di geni della famiglia **TBX** e di **ANF** (atrial natriuretic factor), nonché di proteine citoscheletriche e di alcune connessine delle giunzioni gap (**Cx40**). La separazione dell'atrio dal ventricolo, a cui contribuisce la formazione dei cuscinetti endocardici, è poi specificata dall'espressione localizzata di svariati fattori di trascrizione nella porzione anteriore o posteriore del tubo; questa avviene quando le cellule del miocardio producono fattori, quali membri della famiglia del TGFβ, che inducono le cellule dell'endocardio a formare i diverticoli che invadono la gelatina cardiaca (Fig. 17-34A).

Una volta definite le camere cardiache, il mantenimento di un flusso unidirezionale del sangue viene garantito dalla formazione delle valvole cardiache. Alla base di questo processo vi è una complessa rete di vie di trasduzione del segnale che media la comunicazione fra le cellule dell'endocardio e quelle del miocardio. Diremo solamente che questa rete coinvolge fattori di crescita come **VEGF**, **TGFβ**, **BMP**, come anche membri della famiglia **WNT** ed **EGF**, componenti della matrice come l'**acido ialuronico** e messaggeri intracellulari quali la **Neurofibromina** e **ioni $Ca^{2+}$** (Fig. 17-34B).

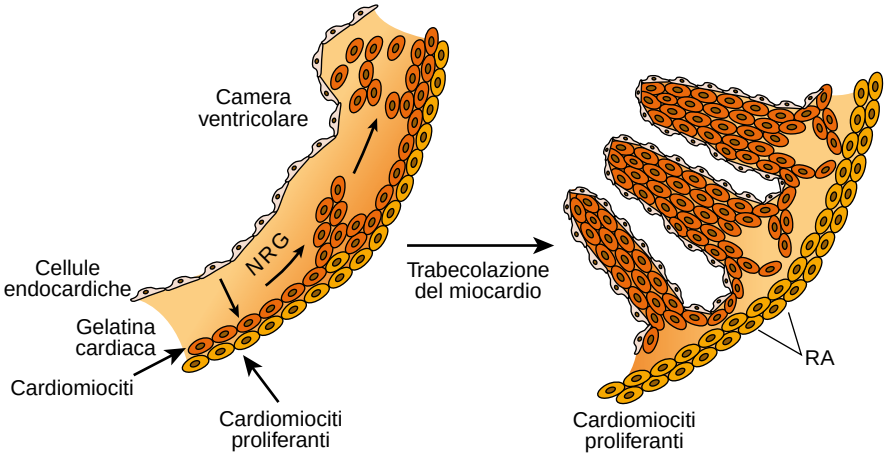



**Figura 17-33** ■ Modello della via di neuregulina (NRG) nella formazione del miocardio trabecolato. La neuregulina, prodotta dalle cellule dell'endocardio, induce le cellule del miocardio a proliferare, delaminare e popolare le trabecole in formazione. A questa stimolazione partecipa anche l'acido retinoico (RA) prodotto dall'epicardio.

## *La formazione del pacemaker e del sistema di conduzione della contrazione cardiaca*

I tessuti cardiaci che si sviluppano al di fuori delle camere cardiache svolgono molti ruoli cruciali nello sviluppo del cuore. Oltre a fornire i segnali per la formazione dei cuscinetti endocardici delle valvole e dei setti, formano gli elementi specializzati del **sistema centrale di conduzione**, che include il **nodo seno-atriale**, il **nodo atrio-ventricolare** e il **sistema di conduzione ventricolare** (fascio di His). Il nodo seno-atriale e quello atrio-ventricolare derivano rispettivamente dal miocardio del seno venoso e del canale atrio-ventricolare. Il sistema di conduzione ventricolare sembra invece derivare dalla com-

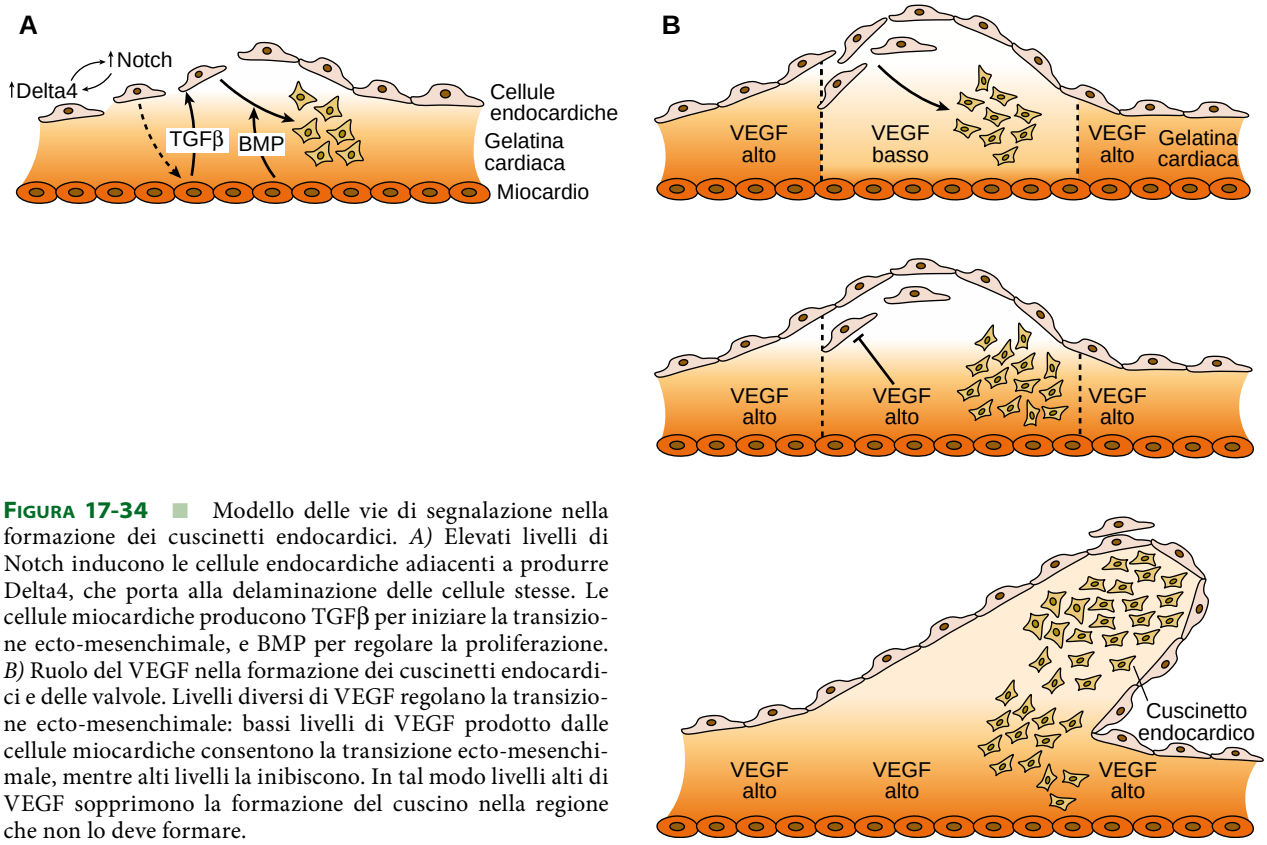



**Figura 17-34** ■ Modello delle vie di segnalazione nella formazione dei cuscinetti endocardici. *A)* Elevati livelli di Notch inducono le cellule endocardiche adiacenti a produrre Delta4, che porta alla delaminazione delle cellule stesse. Le cellule miocardiche producono TGFβ per iniziare la transizione ecto-mesenchimale, e BMP per regolare la proliferazione. *B)* Ruolo del VEGF nella formazione dei cuscinetti endocardici e delle valvole. Livelli diversi di VEGF regolano la transizione ecto-mesenchimale: bassi livelli di VEGF prodotto dalle cellule miocardiche consentono la transizione ecto-mesenchimale, mentre alti livelli la inibiscono. In tal modo livelli alti di VEGF sopprimono la formazione del cuscino nella regione che non lo deve formare.

ponente trabecolare del ventricolo, incluso il setto interventricolare. Un sistema di conduzione si sviluppa già nel tubo cardiaco prima che le diverse regioni siano riconoscibili. I cardiomiociti della regione caudale del tubo cardiaco sono intrinsecamente inclini a depolarizzare spontaneamente; questo crea un'attività di **pacemaker** dominante in questa regione, che inizia la lenta propagazione del potenziale d'azione in direzione anteriore e ondate irregolari di contrazioni peristaltiche. La rapida conduzione attraverso il miocardio delle camere cardiache viene poi acquisita quando queste maturano. Di nuovo gradienti di morfogeni, quali l'acido retinoico o membri della famiglia BMP, controllano probabilmente questa attività. Studi recenti suggeriscono che, in seguito alla comparsa nel tubo cardiaco di cellule che esprimono **NKX2.5**, una popolazione di cellule NKX2.5 negative si diversifica nella regione più caudale. Mentre il miocardio del tubo cardiaco matura, NKX2.5 inibisce l'espressione del canale di membrana responsabile dell'attività pacemaker, **HCN4** (hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated 4) e di **TBX3**, che inibisce la formazione delle camere cardiache, rinforzando il progressivo restringimento della loro espressione alla regione del nodo seno-atriale.

## *Le creste neurali nello sviluppo del cuore*

Come abbiamo visto nel Capitolo 13, una sottopopolazione delle cellule della cresta neurale, localizzata subito al di sotto di quella cefalica, fra il placode otico e il quarto somite, costituisce quella che viene chiamata la **cresta neurale cardiaca** (CNC). Queste cellule migrano nell'abbozzo cardiaco attraverso il terzo, quarto e sesto arco faringeo, e forniscono cellule mesenchimali al cuore e alle grandi arterie. Nonostante questi eventi siano stati temporalmente ben definiti grazie soprattutto all'utilizzo delle chimere quaglia-pollo, le nostre conoscenze sui fattori che inducono le CNC e le loro vie di migrazione sono ancora limitate. Nella loro migrazione, le cellule della CNC colonizzano gli archi faringei, inizialmente composti da mesenchima di origine mesodermica e vanno a sostituirlo in gran parte; questo poi condensa e differenzia in tessuto connettivo fibroso che contribuisce alla stabilizzazione vascolare delle grandi arterie (Fig. 17-35).

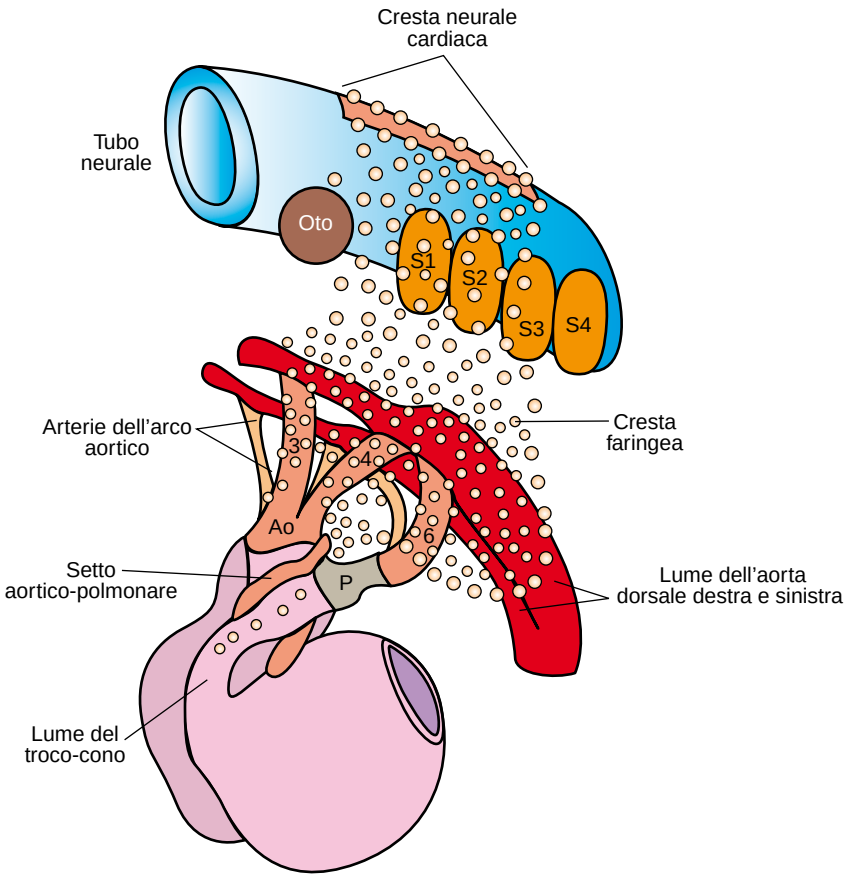



**Figura 17-35** ■ Rappresentazione schematica della migrazione delle cellule della cresta neurale (CNC). Le CNC migrano nella cresta faringea, negli archi faringei caudali (3, 4 e 6) e nel bulbo cardiaco prima del rimodellamento asimmetrico delle arterie dell'arco aortico. Notare che alcune cellule migrano all'interno e circondano le arterie nascenti dell'arco aortico, mentre altre continuano a migrare ed eventualmente colonizzano il setto aortico-polmonare. S1,S2, S3, S4: somiti 1-4; Oto: vescicola otica.

Una sottopopolazione di CNC continua la migrazione per colonizzare i cuscinetti cono-troncali e, con meccanismi ancora sconosciuti, contribuire alla formazione del **setto aortico-polmonare**. In questo contesto la faringe potrebbe essere la sorgente di segnali istruttivi per la migrazione delle cellule della CNC. Il destino primario di questa popolazione è di differenziare in cellule muscolari lisce delle arterie dell'arco aortico e del tratto cardiaco di efflusso e richiede l'espressione del recettore per il **PDGF** (platelet derived growth factor), PDGF-R, e dei recettori **ALK2/5** (activin receptor-like kinase 2 e 5) per membri della famiglia del TGFβ.

Per quel che riguarda il rimodellamento delle arterie dell'arco aortico, l'analisi di topi mutanti, ha permesso d'identificare diversi geni richiesti per gli eventi morfogenetici e induttivi che coinvolgono le cellule della CNC. Alcuni geni, come ***Pax3*** (paired box 3) e ***Ap2*** (adipocyte lipid-binding protein 2), sono espressi dalle cellule della CNC durante la migrazione. Evidenze più recenti suggeriscono che le interazioni e la specificazione delle cellule della CNC siano mediate da fattori trascrizionali che coinvolgono membri della famiglia **FOXC**, **HAND** e **TBX**. Un altro set di geni sarebbe espresso dai vasi neoformati (***Vegf***, ***Nrp1*** [neuropillin 1]) o dalle cellule mesenchimali (***Mef2*** [myocyte enhancer factor 2), ***Tf*** [tissue factor]) e avrebbe un ruolo nella formazione, stabi-

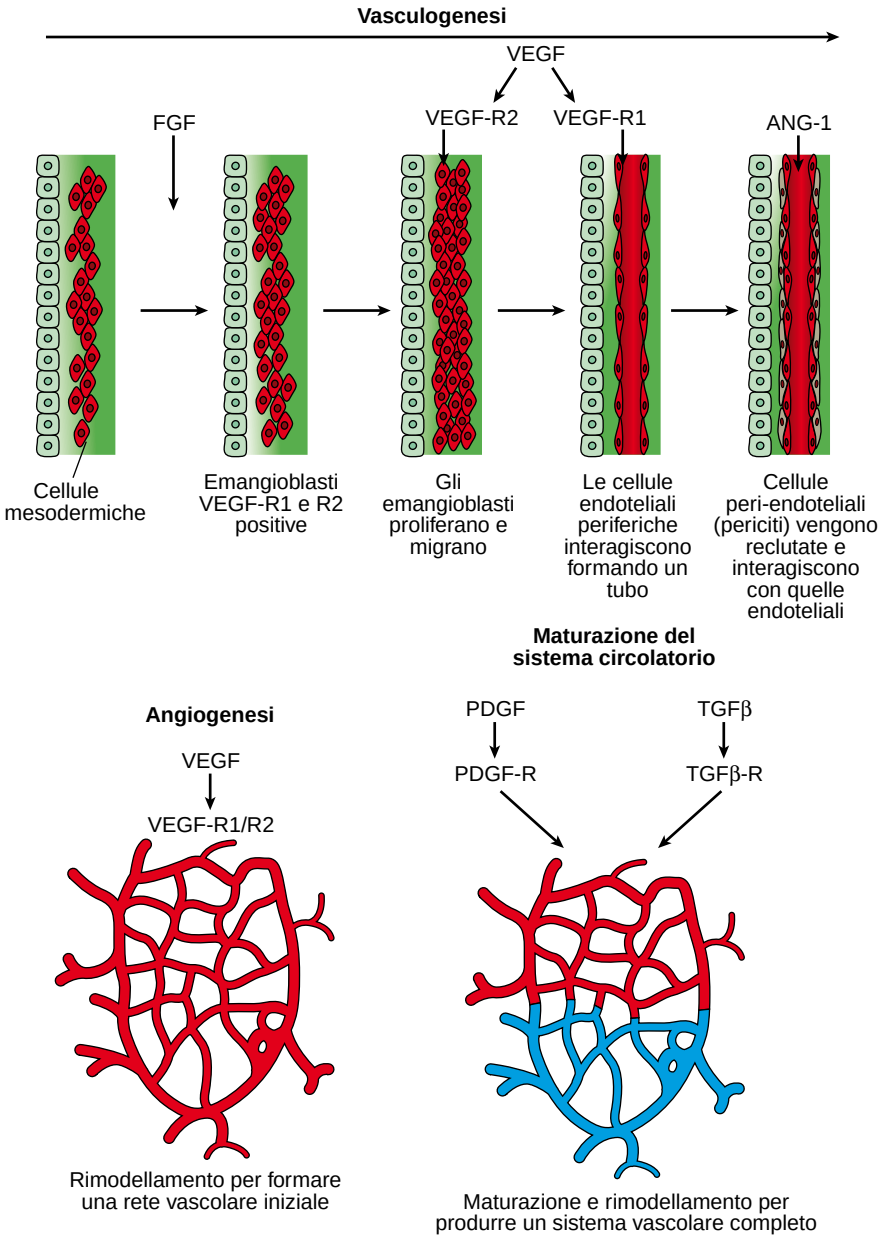



**Figura 17-36** ■ Vie di segnalazione coinvolte nella formazione dei vasi sanguigni.

lizzazione e rimodellamento dei vasi. Una sottopopolazione di cellule della CNC continua la migrazione e colonizza i cuscinetti endocardici. Considerando che la maggior parte dei marcatori molecolari delle cellule CNC scompare quando le cellule colonizzano i cuscinetti e non sono disponibili sufficienti studi genetici, la sorte di queste cellule è ancora incerta. Sembra infine che la maggior parte delle cellule della CNC che costituisce il primitivo mesenchima aortico-polmonare e cono-troncale muoia per apoptosi o venga sostituita quando si è completato il setto.

## *La formazione dei vasi sanguigni*

I vasi sanguigni si formano indipendentemente dal cuore, per poi collegarsi ad esso. La **vasculogenesi** sembra essere controllata principalmente da tre fattori di crescita: l'**FGF**, il **VEGF** e l'**Angiopoietina-1** (ANG-1). L'FGF è richiesto per il differenziamento iniziale delle cellule del mesoderma splancnico in **angioblasti**; il VEGF è poi necessario per la proliferazione e il differenziamento degli angioblasti più esterni per formare l'endotelio, mentre l'ANG-1 è responsabile dell'interazione tra le **cellule endoteliali** e i **periciti**, le cellule che rivestono l'endotelio. La successiva **angiogenesi** è richiesta per il rimodellamento della rete vascolare e per la formazione delle arterie e delle vene. Questi processi richiedono la perdita di contatti fra le cellule endoteliali e la degradazione della matrice extracellulare in alcuni punti, in modo che le cellule esposte proliferino ed eventualmente formino nuovi vasi. Tali eventi sembrano essere regolati dall'azione del VEGF sui capillari neo-formati. Quando la rete capillare si forma, viene poi stabilizzata dall'azione del TGFβ, con la produzione di componenti della matrice extra-cellulare con funzione di sostegno, e dal PDGF, che richiama i periciti, che contribuiscono alla flessibilità meccanica della parete capillare (Fig. 17-36). Nonostante la comprensione dei meccanismi alla base della diversificazione delle arterie dalle vene sia ancora molto limitata, studi effettuati nell'ultima decade, suggeriscono che sia coinvolto, almeno in parte, il sistema delle **efrine** e dei loro recettori **Eph-RTK** (ephrine-tyrosine kinase receptor). È stato infatti visto che il plesso primario capillare contiene due tipi di cellule endoteliali: i precursori delle arterie, che esprimono l'**Efrina B2** sulla loro membrana, e quelli delle vene, che esprimono il suo recettore **EphB4**. Si ritiene che l'interazione fra queste molecole di superficie svolga un duplice ruolo durante l'angiogenesi: alle estremità dei capillari venosi e arteriosi garantisce che quelli arteriosi si connettano solo a quelli venosi; nelle zone non terminali, invece, dovrebbe assicurare che la fusione dei capillari per formare vasi più grandi avvenga solo fra vasi dello stesso tipo (Fig. 17-37).

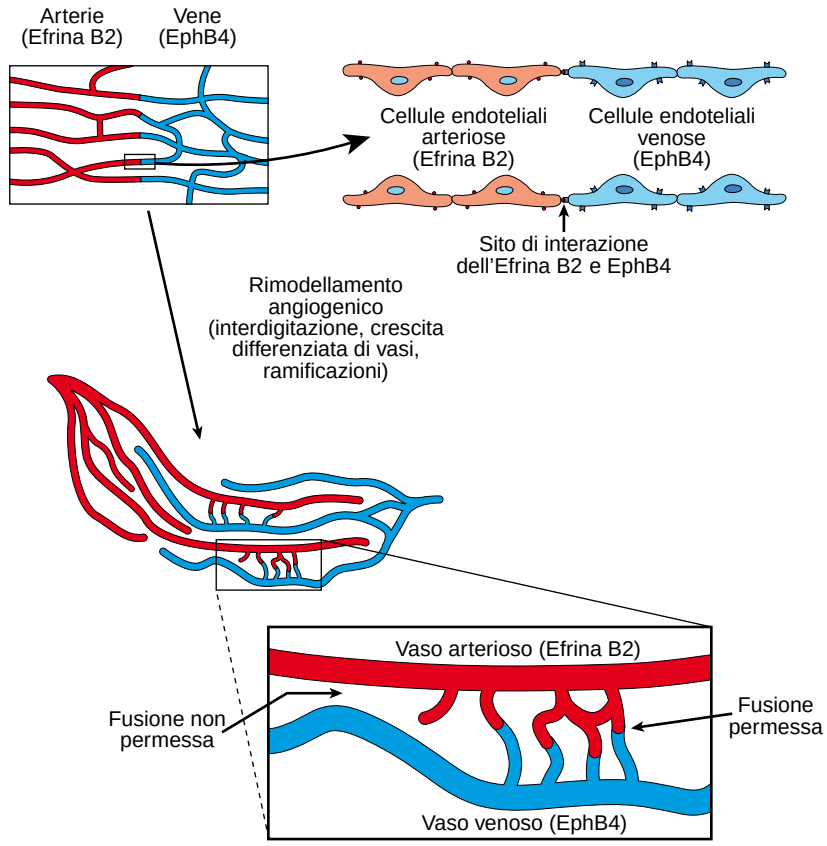



**Figura 17-37** ■ Ruolo del sistema delle efrine e dei loro recettori eph nella diversificazione dei vasi sanguigni.

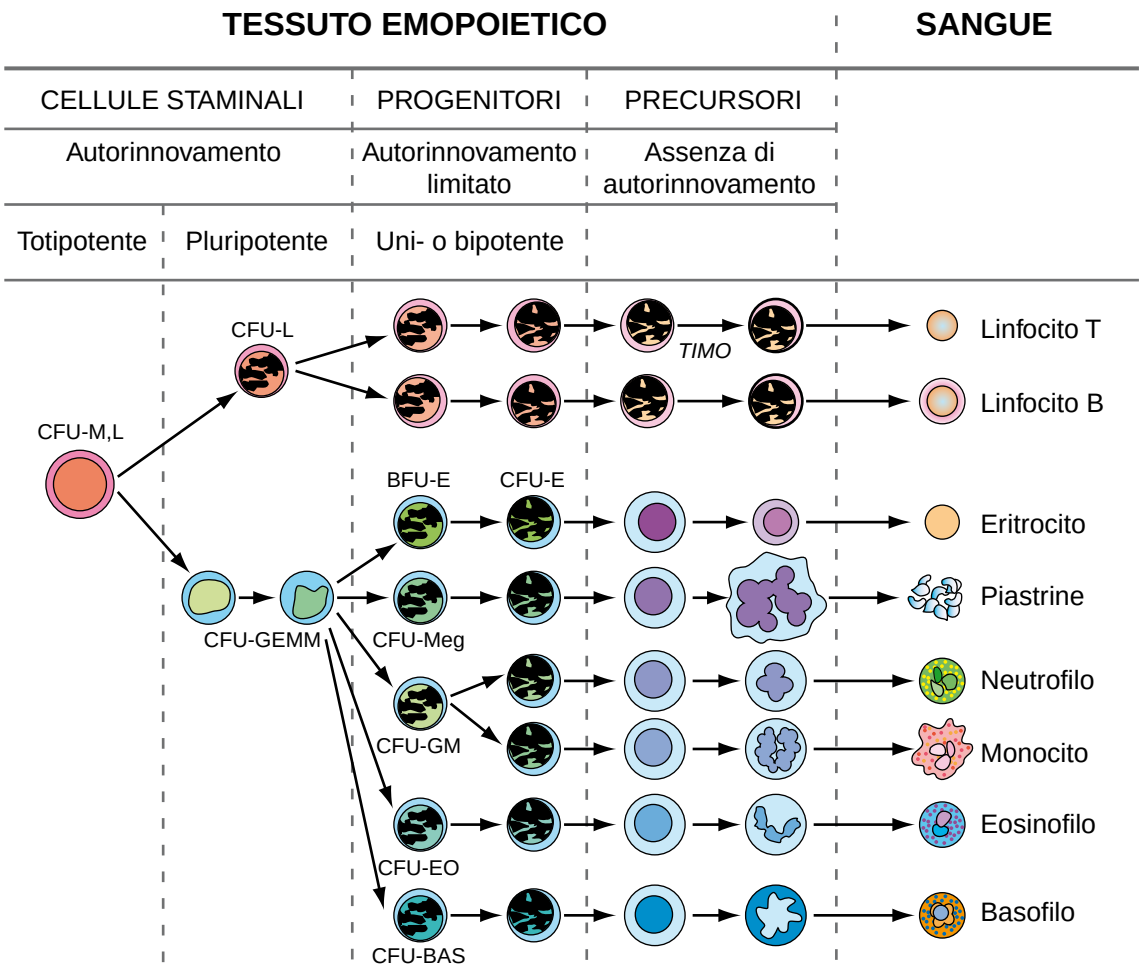



**Figura 17-38** ■ Cinetica delle cellule staminali dai progenitori ai precursori fino alle cellule mature del sangue. (*Da* S. Adamo e coll., Istologia di V. Monesi, V edizione, III ristampa, Piccin Nuova Libraria, Padova, 2002.)

## *L'emopoiesi embrio-fetale e l'origine delle cellule staminali emopoietiche*

Lo sviluppo del sangue nei vertebrati avviene in due fasi successive: una **fase embrio-fetale** transitoria, e una **fase adulta** definitiva. Queste fasi differiscono nella sede di produzione degli elementi figurati del sangue, nei tempi necessari per l'emopoiesi, nella morfologia delle cellule prodotte, nonché nel tipo di globine prodotte dagli eritrociti. La fase embrio-fetale è probabilmente utilizzata per iniziare la circolazione che fornisce prima all'embrione e poi al feto le prime cellule del sangue e la prima rete vascolare. L'emopoiesi adulta fornisce più tipi cellulari grazie alle **cellule staminali emopoietiche pluripotenti** (**HSC** o **P-HSC**, pluripotent hematopoietic stem cells) che dureranno per tutta la vita dell'individuo. La cellula staminale è caratterizzata dalla capacità di dare origine ad altre cellule staminali oltre che a cellule differenziate. Le cellule staminali emopoietiche sono identificabili per l'espressione di alcune molecole di superficie tra cui **CD34**. Il sistema emopoietico è un sistema complesso costituito da popolazioni cellulari riconducibili a distinti compartimenti, disposti in successione: il **compartimento staminale**, quello dei **progenitori** e quello dei **precursori** (Fig. 17-38). Se le PHSCe possono dare origine a tutti gli elementi del sangue, inclusi i linfociti, le successive cellule staminali restringono il loro potenziale differenziativo, attraverso un processo di **determinazione**, diventando **CFU-GEMM** (unità formanti granulociti, eritrociti, macrofagi e megacariociti) o **CFU-L** (unità formanti linfociti B e T), che mantengono comunque multipotenzialità. Dal compartimento staminale si passa poi a quello dei progenitori. Il passaggio dal compartimento staminale a quello dei progenitori, e da quello dei progenitori a quello dei precursori, dipende dall'espressione differenziale di recettori per fattori di crescita, che, secondo il modello induttivo, sarebbe determinato dal microambiente che elabora gli appropriati segnali locali. Il microambiente, quindi, fornisce alle cellule emopoietiche la struttura di sostegno durante la proliferazione e il differenziamento, influenza il processo di determinazione, consente mediante interazioni adesive la co-localizzazione delle cel-

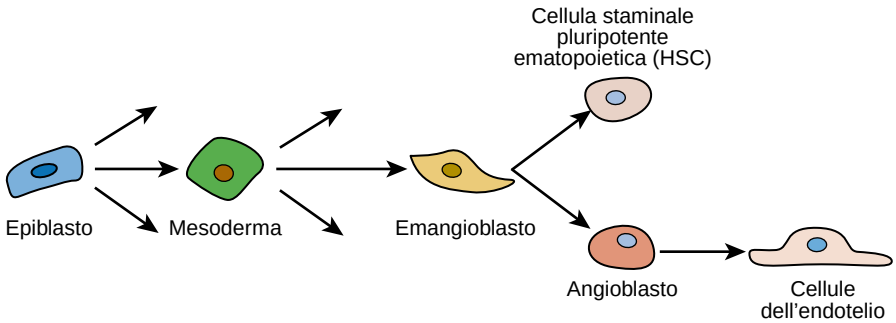



**FIGURA 17-39** ■ Origine delle cellule emopoietiche e di quelle endoteliali.

lule staminali e dei progenitori con i fattori di crescita, fornisce siti di legame per i fattori di crescita determinandone una concentrazione localizzata.

L'emopoiesi embrionale inizia a livello delle **isole sanguigne** nel mesoderma laterale vicino al sacco vitellino. Come abbiamo visto precedentemente, gli angioblasti del mesoderma laterale possono dare origine a cellule endoteliali dei vasi e a cellule del sangue, anche se alcuni autori ritengono che questa proprietà sia di un precursore dell'angioblasto chiamato emoangioblasto (Fig. 17-39). Il livello di **BMP2** e di **BMP4** espresso nel mesoderma laterale è probabilmente responsabile della formazione del sangue e dei vasi sanguigni. La popolazione di cellule staminali emopoietiche (HSC) del sacco vitellino, pur essendo potenzialmente in grado di dare origine ad eritrociti, granulociti e monociti, ma non a linfociti, è dotata di una limitata capacità di autorinnovamento. Si ritiene che la cellula staminale emopoietica che rimane nella vita adulta si origini dal mesoderma della regione **aorta-gonado-mesonefrica** (AGM), e sia responsabile della colonizzazione degli organi emopoietici attivi nel periodo embrio-fetale e nella vita postnatale. Alla 5ª settimana di sviluppo, tali cellule colonizzano il fegato, che sarà il principale organo emopoietico per il resto della vita embrionale e la prima parte del periodo fetale (Fig. 17-39, vedi anche Fig. 17-5) e provvederà alla produzione degli elementi eritroidi e mieloidi, nonché dei linfociti B. Successivamente, le cellule staminali migrano nel midollo osseo, nel timo e nella milza (Fig. 17-40). La produzione di linfociti T a livello del timo comincia alla 10ª settimana. Dopo la nascita, il principale organo emopoietico è il midollo osseo.

## ASPETTI CLINICI

Da uno a quattro bambini su cento nascono con un difetto cardiovascolare congenito importante, che mette a repentaglio la funzione di uno o più organi. Alcuni di questi difetti, però, non sono identificati alla nascita, ma nel corso della crescita. Circa il 7,5% dei bambini riceverà una diagnosi di difetto congenito minore entro i primi cinque anni di vita: ovviamente si tratta di piccole alterazioni che, nella maggior parte dei casi, non compromettono lo stato generale di salute.

Molti difetti congeniti possono essere diagnosticati prima della nascita: è questa la funzione dei controlli prenatali, in particolare dell'ecografia morfologica, che viene effettuata tra la 20ª e la 22ª settimana di gestazione. Alla nascita i difetti più gravi sono associati a cianosi (inadeguata ossigenazione del sangue).

Le anomalie del cuore e del sistema vascolare rappresentano la più estesa categoria di difetti congeniti umani, chiamati nell'insieme **disordini cardiaci congeniti** (congenital heart diseases, CHD), e la causa maggiore di morte infantile sotto l'anno di età. Le CHD umane possono essere classificate in:

- difetti del setto atriale (DSA);
- difetti del setto atrio-ventricolare (DSAV);
- difetti del setto interventricolare o ventricolare (DSV);
- malformazioni della regione conotroncale (tetralogia di Fallot, persistenza del tronco arterioso, malformazioni dell'arco aortico e trasposizione dei grossi vasi);
- malformazioni associate all'eterotassia.

**TABELLA 17-3**
Patologie dello sviluppo del sistema cardiocircolatorio

| |
|---|
| ■ Anomalie del setto atriale |
| Ostium secundum |
| Ostium primum |
| Atrio comune |
| ■ Anomalie del setto atrio-ventricolare |
| Canale atrio-ventricolare |
| ■ Anomalie del setto ventricolare |
| ■ Anomalie del sistema arterioso |
| Persistenza del dotto arterioso |
| Coartazione del dotto arterioso |
| ■ Anomalie del sistema venoso |
| Ritorno venoso polmonare anormale parziale o totale |
| ■ Malformazioni cardiache complesse |
| Atresia della tricuspide |
| Atresia dell'aorta |
| Tetralogia di Fallot |

Nella tabella sono riportate le più comuni patologie del sistema cardiocircolatorio dovute a difetti dello sviluppo; alcune di queste patologie sono descritte nel testo.

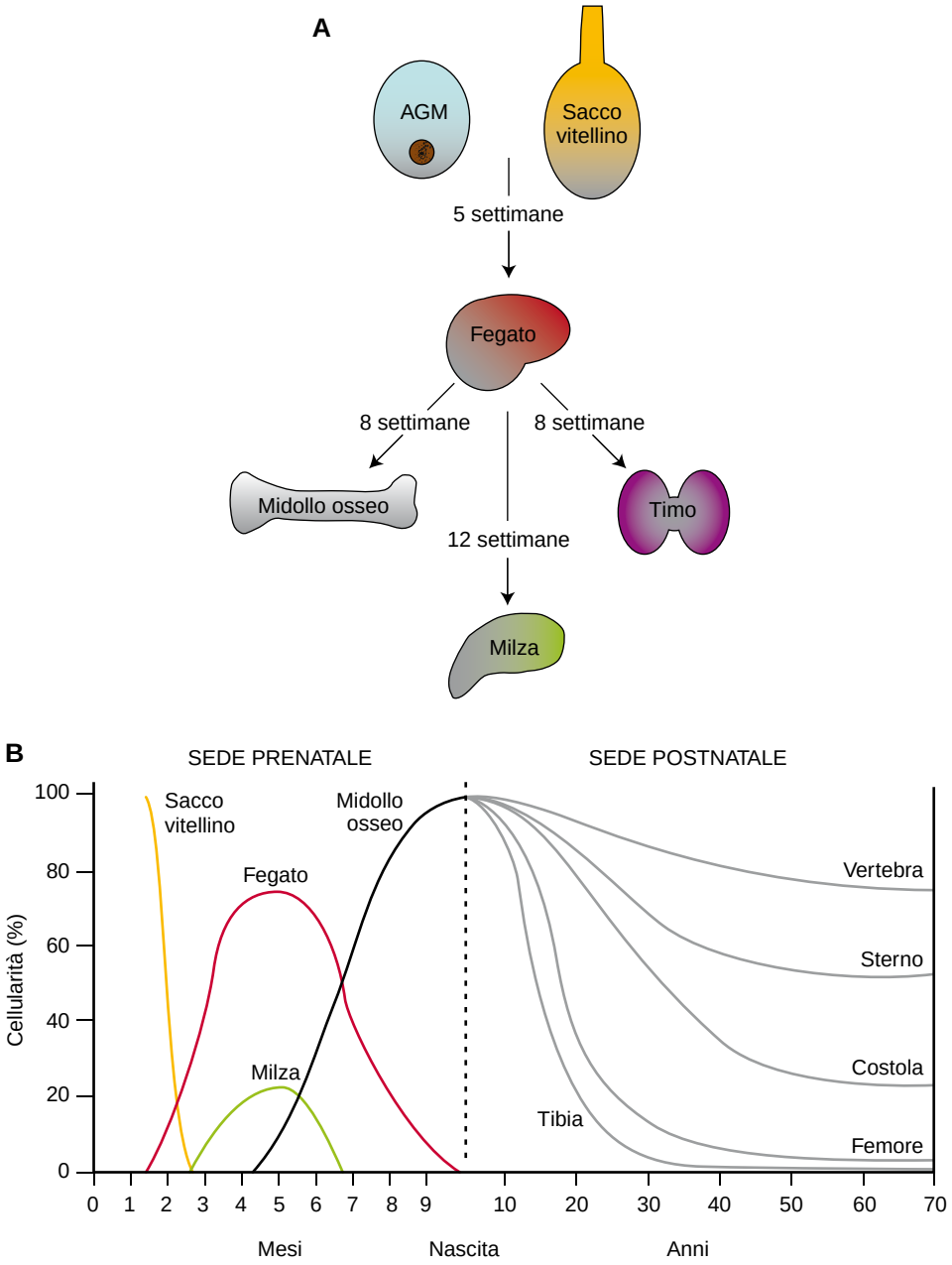



**Figura 17-40** ■ *A)* Ontogenesi dell'emopoiesi nell'uomo (*da* S. Adamo e coll., Istologia di V. Monesi, VI ed., Piccin Nuova Libraria, Padova, 2012). *B)* Sedi dell'emopoiesi durante la vita fetale e nell'adulto (*da* A.J. Erslev, T.G. Gabuzda, Pathophysiology of blood, 2nd ed., Philadelphia, Saunders, 1979.)

Ovviamente ognuna di queste anomalie è caratterizzata da gravità, prognosi e decorso diversi, nonché da differenti destini terapeutici. Inoltre, all'interno di ogni classe l'ampiezza del difetto può variare da caso a caso, conferendo ulteriore diversità individuale alle manifestazioni cliniche e alle scelte terapeutiche.

## Cause genetiche ed ambientali delle CHD

Viene stimato che circa l'8% delle malformazioni cardiache è dovuto a fattori genetici, il 2% ad agenti ambientali e la maggior parte è causata da complesse interazioni tra fattori genetici e ambientali (cause multifattoriali).

Durante l'ultima decade la caratterizzazione delle anomalie genetiche delle CHD ha cominciato a chiarire le cause molecolari di questi difetti. Gli studi sull'uomo, coadiuvati dagli studi effettuati su modelli animali, hanno fornito molte informazioni sul ruolo di diversi geni nello sviluppo dell'apparato cardiovascolare fornendo indicazioni per la patogenesi dei disordini correlati. Solo il 20% delle CHD genetiche originano da ano-

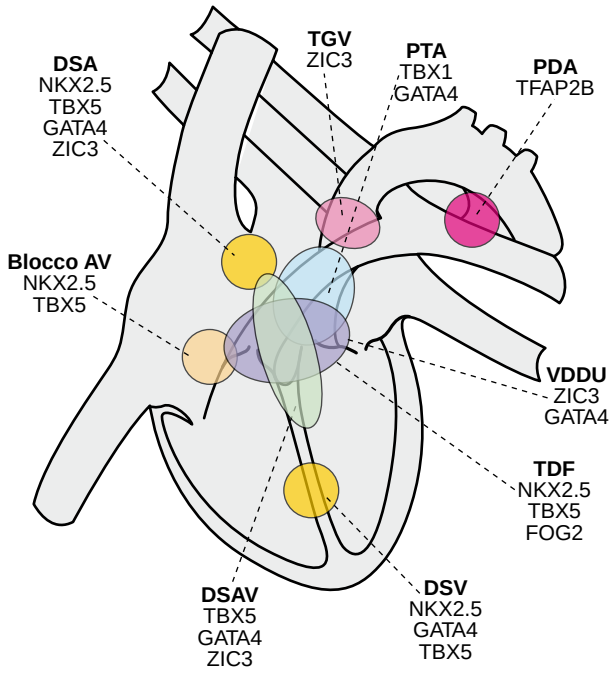



**Figura 17-41** ■ Siti delle anomalie strutturali associate a mutazioni di fattori di trascrizione. DSA = difetti del setto atriale; DSV = difetti del setto ventricolare; DSAV = difetti del setto atrio-ventricolare; AV = difetti delle valvole atrio-ventricolari; VDDU = ventricolo destro a doppia uscita; PDA = dotto arterioso pervio; PTA = persistenza del tronco arterioso; SP = stenosi polmonare; TGV = trasposizione dei grossi vasi; TDF = tetralogia di Fallot.

malie cromosomiche o hanno una trasmissione mendeliana, mentre il restante 80% viene definita sporadica. I meccanismi genetici alla base delle CHD sporadiche sono al momento poco conosciuti. Studi epidemiologici hanno dimostrato un rischio superiore al 2-5% in fratelli o discendenti rispetto alla norma, suggerendo un potenziale ruolo di fattori genetici comuni e/o dell'ambiente. Gli esempi più evidenti di cause genetiche sono rappresentati da CHD associate ad alterazioni cromosomiche, come la **trisomia 18** o le sindromi genetiche come le **sindromi di Di Gorge**, **Goldenhar** e **Down**. Svariate mutazioni genetiche sono responsabili di CHD, molte delle quali mostrano dominanza della trasmissione. La maggior parte di questi geni codifica per fattori di trascrizione che regolano vari aspetti dello sviluppo del cuore. Nella Figura 17-41 sono descritti i siti di anomalie strutturali associati a mutazioni di fattori di trascrizione. Ad esempio, mutazioni del gene Tbx5 causano la **sindrome di Holt-Oram**, caratterizzata da anomalie pre-assiali dell'arto e da difetti del setto atriale, accompagnate talvolta da difetti del setto interventricolare. Mutazioni di *NKX2.5* causano principalmente DSA, ma possono essere anche associati a DSV, alla **tetralogia di Fallot** e alla **stenosi valvolare dell'aorta**. La varietà di difetti cardiaci associati con mutazioni di Nkx*2.5* è indicativa del ruolo multifunzionale di questo fattore durante lo sviluppo del cuore. Delezioni nella regione cromosomica dove mappa il gene gata4 sono anche associate a CHD, inclusi DSA, DSV, **destrocardia** e **stenosi polmonare**, e mutazioni di gata4 sono state identificate in alcune di queste condizioni. Le malformazioni cardiache associate ad eterotassia, un'anormalità anatomica data dall'inversione totale o parziale nella collocazione degli organi, derivano da mutazioni in diversi geni quali ad esempio lefty, nodal e membri della via di notch, che svolgono un ruolo cruciale nel determinare la simmetria destra-sinistra alla gastrulazione (vedi Capitolo 10). Nell'eterotassia legata a X è stato individuato zic3 (zinc-finger protein of cerebellum) quale gene responsabile; nonostante questo gene non abbia un'espressione cardiaca, sembra svolgere un ruolo fondamentale nella determinazione dell'asse sinistra-destra e di conseguenza nel corretto sviluppo della simmetria del cuore.

Esempi classici di teratogeni cardiovascolari comprendono il virus della rosolia e l'assunzione di talidomide. Altri sono la vitamina A, l'alcool e molti altri composti. Anche malattie materne possono aumentare il rischio di CHD, come il diabete, l'obesità o l'ipertensione. Varianti, presenti nella madre della metilenetetraidrofolato reduttasi (NADPH), un enzima coinvolto nel metabolismo degli aminoacidi, aumenta il rischio di CHD nel neonato di circa 3-6 volte. Studi preliminari indicano che la somministrazione di folato nei primissimi giorni di gravidanza riduce significativamente il rischio di CHD. È importante notare che spesso le CHD sono associate a malformazioni di altri organi.

## *Difetti del setto atriale (DSA), del setto atrio-ventricolare (DSAV) e delle valvole atrioventricolari*

Le DSA e le DSAV comprendono una varietà di condizioni caratterizzate dalla persistenza di un'apertura tra l'atrio sinistro e l'atrio destro, ma anche nella regione membranosa del setto ventricolare e nelle valvole atrioventricolari; possono presentare gravità variabile a seconda dell'ampiezza dell'apertura e della localizzazione del difetto (Fig. 17-42). La condizione più comune (circa il 10% di tutte le CHD e l'80% di tutte le DSA) è quella definita **difetto dell'ostium secundum**, localizzata nella parte centrale del setto interatriale (Fig. 17-43). Può essere un'apertura unica o presentarsi sotto forma di numerose piccole aperture. Può essere provocato da morte cellulare o da riassorbimento (o da mancato sviluppo) del **septum primum** o anche da sviluppo insufficiente del **septum secundum**. Quando il septum secundum, invece di continuare nel suo sviluppo, riduce il suo accrescimento sino ad arrestarsi definitivamente in vicinanza dello sbocco della vena cava superiore e non si fonde con il septum primum, rimane una caratteristica apertura che prende il nome di pervietà del forame ovale. La permanenza della comunicazione tra gli atri alla nascita, porta da un passaggio (shunt) di sangue dall'atrio sinistro a quello destro e può essere asintomatica. Nel tempo però si verifica un ipertrofia dell'atrio e del ventricolo di destra. A questa si accompagna un flusso

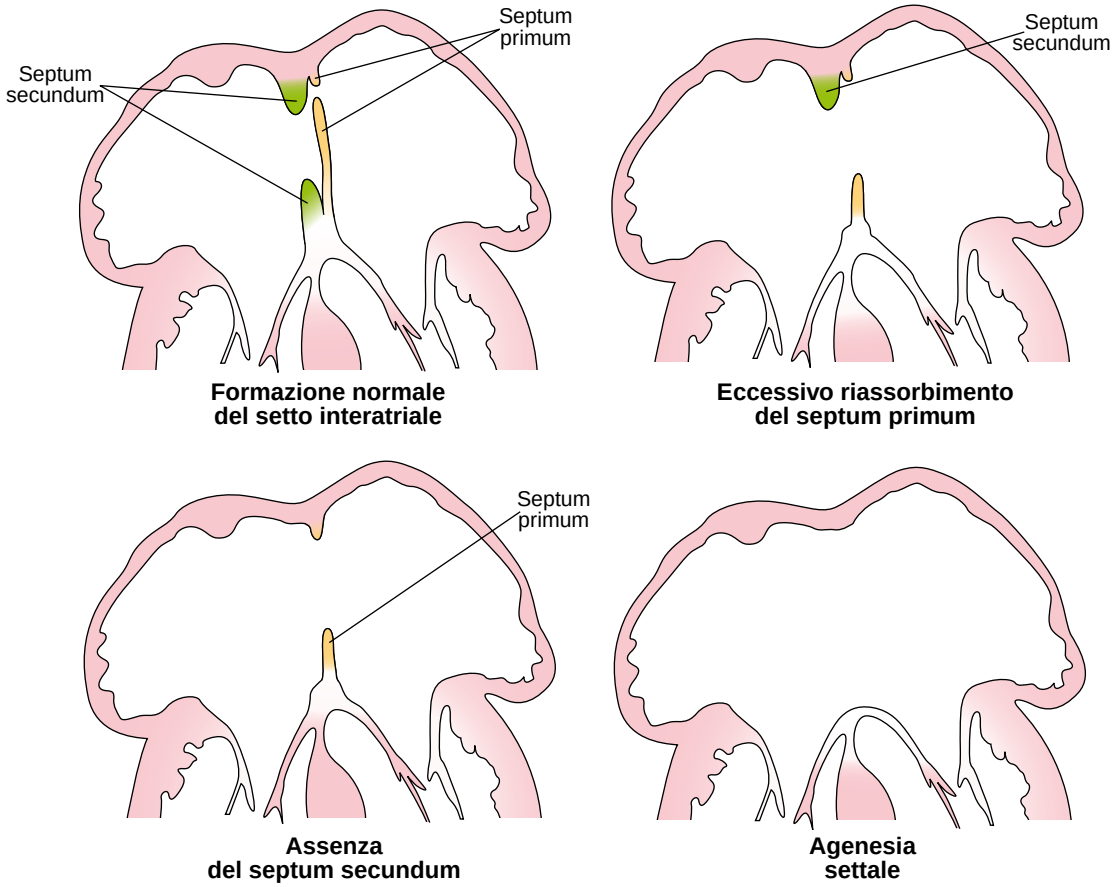



**Figura 17-42** ■ Anomalie del setto atriale.

eccessivo di sangue ai polmoni e un'ipertrofia e ipertensione degli stessi che se non corretta chirurgicamente può portare ad arresto cardiaco.

A volte, invece, il **forame ovale** si chiude prima della nascita. Questa condizione, definita **prematura chiusura del forame ovale**, causa ipertrofia dell'atrio e del ven-

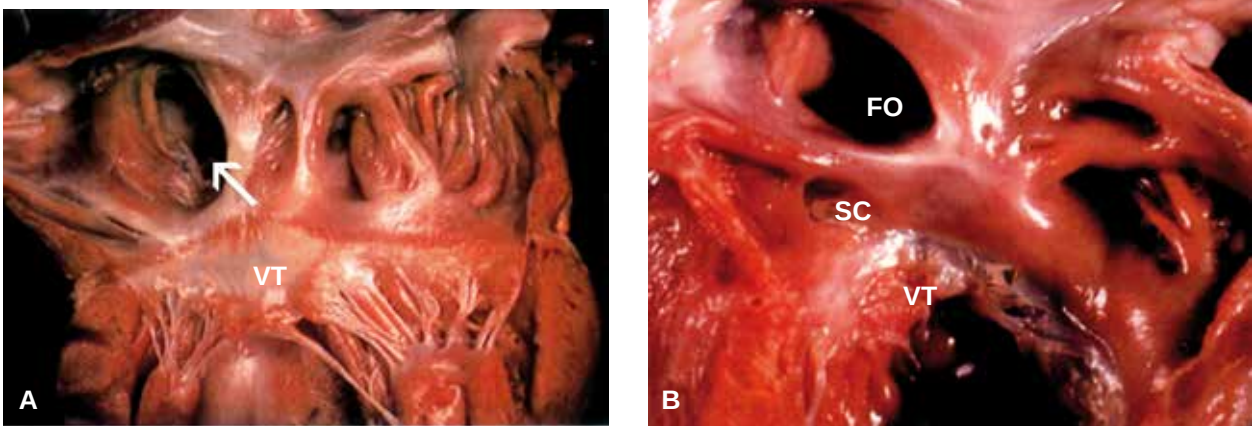



**Figura 17-43** ■ Esempi di DSA. *A)* La valvola del forame ovale è assente (freccia), VT = valvola tricuspide. *B)* La valvola del forame ovale è assente (FO). VCS = vena cava superiore, VT = valvola tricuspide, SC = seno coronario. (*Da* E. Gilbert-Barness, D. Debich-Spicer, Embryo and fetal pathology, Cambridge University Press, 2004, per gentile concessione)

tricolo destro e insufficiente sviluppo del cuore sinistro. Di norma porta a morte alla nascita.

La più grave anomalia DSA è rappresentata dall'**atrio comune**; questa forma molto rara deriva dalla mancanza totale di sviluppo del setto interatriale o dalla confluenza di più e differenti tipi di difetti interatriali che possono portare alla configurazione di un atrio praticamente unico.

Altre anomalie che possono portare a difetti DSA includono **difetti del seno venoso** e **del seno coronarico**, causati da un'anomalia dello sviluppo dei residui del corno destro e sinistro del seno venoso, che esitano in anomalie nella struttura settale: il primo nella parte posteriore alta, il secondo, in vicinanza del seno coronarico. Il difetto del seno venoso deriva dal mancato spostamento a destra del seno venoso e quindi dalla mancanza dello spazio necessario per lo sviluppo del septum secundum. Questo difetto è statisticamente presente nel 5-10% delle DSA. Il difetto del seno coronario è invece il risultato della totale o parziale deficienza di sviluppo della parete tra seno coronarico ed atrio sinistro. La conseguenza di questo difetto è che il sangue dell'atrio sinistro drena nel seno coronarico e quindi nell'atrio destro. Spesso è associato alla persistenza di una cava superiore sinistra.

A livello del canale atrio-ventricolare difetti nello sviluppo del setto atrioventricolare o setto intermedio (DSAV), dovuti al mancato/parziale sviluppo o mancata/parziale fusione dei cuscinetti endocardici dorsale e ventrale, possono causare un **difetto di tipo ostium primum** con mancato sviluppo della parte inferiore del septum primum; la conseguenza è una pervietà interatriale a localizzazione bassa (Fig. 17-44). Altri tipi di DSAV sono dovuti a difetti nello sviluppo dei cuscinetti endocardici con anomalie nella formazione della parte membranosa del setto interventricolare e la conseguente mancata o incompleta chiusura del forame interventricolare.

I difetti delle valvole atrioventricolari (AV) sono causati da anomalie nel rimodellamento delle cuspidi, delle corde tendinee o dei muscoli papillari a livello dei cuscinetti endocardici e del miocardio ventricolare. Le cause della **completa atresia valvolare** sono sconosciute. Il mancato allineamento dei canali atrioventricolari con i rispettivi ventricoli porta ad un ventricolo che ha **due influssi** o **due efflussi di sangue**.

## *Difetti del setto ventricolare (DSV) e malformazioni della regione conotroncale*

Le DSV derivano da anomalie nella formazione del setto che separa i due ventricoli. A seconda della regione del setto interessato dal difetto si distinguono varie forme. Esistono anche casi in cui sono presenti contemporaneamente più localizzazioni (difetti interventricolari multipli). I difetti interventricolari perimembranosi, a livello della regione membranosa del setto, sono le CHD più comuni. Occasionalmente il difetto interessa anche la regione muscolare del setto. Spesso i difetti a livello della regione membranosa del setto sono associati a difetti nella divisione della regione conotroncale in quanto, come descritto nei paragrafi precedenti, queste regioni si sviluppano a seguito di processi comuni. Le cause DSV so-

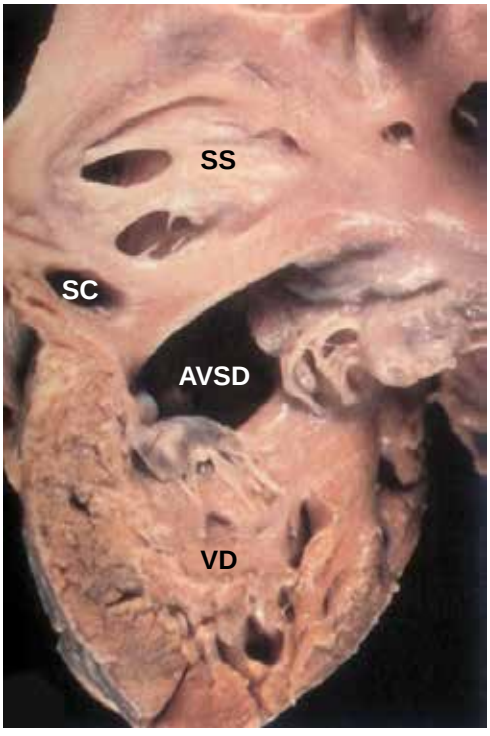



**Figura 17-44** ■ Esempio di DSAV. Il septum secundum (FO) è fenestrato e la porzione apicale del setto ventricolare è intatta. Il septum primum e il setto interventricolare non si dono fusi. (*Da* E. Gilbert-Barness, D. Debich-Spicer, Embryo and fetal pathology, Cambridge University Press, 2004, per gentile concessione)

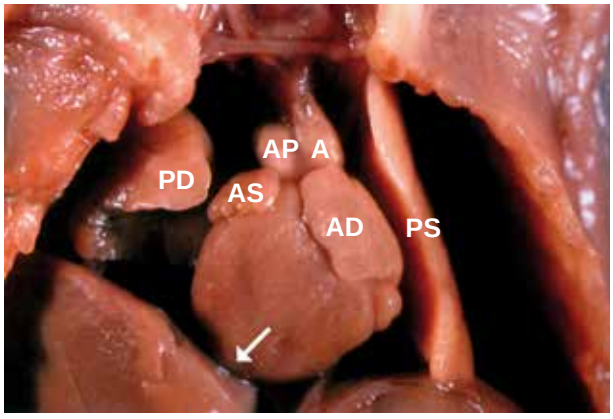



**Figura 17-45** ■ Destrocardia in un feto con *situs inversus*; l'apice del cuore è verso destra (freccia), invece che a sinistra, PD = polmone destro, AS = atrio sinistro, AP = arteria polmonare, A = aorta, PS = polmone sinistro. (*Da* E. Gilbert-Barness, D. Debich-Spicer, Embryo and fetal pathology, Cambridge University Press, 2004, per gentile concessione)

no almeno quattro: 1) mancata fusione tra la regione membranosa e muscolare del setto; 2) difetti dello sviluppo del setto conotroncale; 3) mancanza di fusione tra i cuscinetti endocardici ventrale e dorsale; 4) insufficiente crescita della porzione muscolare del setto. L'effetto di questi difetti è che il sangue, in quantità variabile a seconda della sede e dimensione del difetto, passa dal ventricolo sinistro a quello destro (shunt sinistro-destro) sovraccaricando il circolo polmonare (Fig. 17-45).

Il difetto più comune della regione conotroncale è la **tetralogia di Fallot**. Si tratta di una malformazione cardiaca dovuta ad uno spostamento in avanti del setto conotruncale e la conseguente mancata fusione con i cuscinetti endocardici. La tetralogia, come si evince dal nome, presenta quattro elementi anatomici: 1) difetto interventricolare a livello della regione membranosa (comunicazione fra i due ventricoli); 2) aorta a cavaliere (aorta biventricolare che si trova a cavallo fra i due ventricoli, sopra il difetto interventricolare); 3) stenosi (restringimento) sottovalvolare e valvolare polmonare; 4) ipertrofia (cioè aumento della massa muscolare del miocardio) del ventricolo destro, come conseguenza degli altri difetti. La **persistenza del tronco arterioso** si verifica quando le creste conotruncali non si fondono e non discendono verso i ventricoli. L'evento si traduce nella costituzione di un canale unitario che nasce a cavallo del setto interventricolare e comunica sia col ventricolo destro che con il sinistro, ricevendo sangue da entrambi.

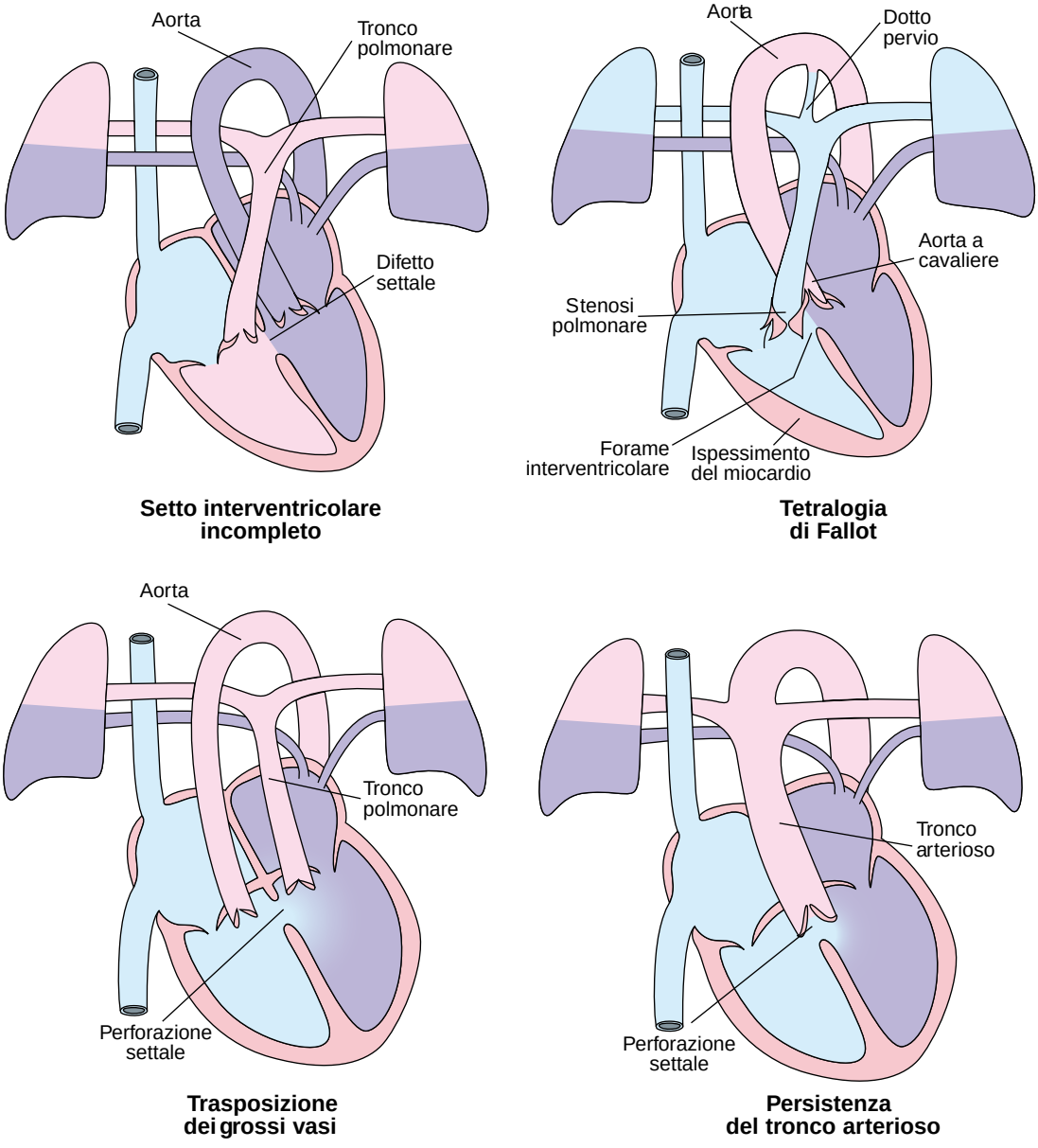



**Figura 17-46** ■ Anomalie del setto ventricolare e della regione conotroncale.

La **trasposizione dei grossi vasi** è la più grave CHD e conduce a morte nel 90% dei casi. È una malformazione relativamente frequente, colpendo il 5-7% dei nati vivi. È dovuta all'inversione dei grossi vasi: l'aorta nasce direttamente dal ventricolo destro e l'arteria polmonare da quello sinistro, causando una grave ipossiemia sistemica. Si verifica quando il setto conotroncale non si spiralizza e scende in linea retta verso il basso.

## Eterotassia

Eterotassia significa "disposizione" (tassia) "diversa" (etero). Si tratta di un posizionamento anormale degli organi toracici e/o addominali con inversione destra/sinistra rispetto alla normalità. È un gruppo abbastanza ampio di difetti, in quanto esistono numerose possibilità di inversione destra/sinistra che possono essere complete (si parla di **situs inversus** o situs inversus totalis, quando tutti gli organi posizionati normalmente a destra si trovano a sinistra e viceversa, Fig. 17-46) o parziali (si parla di situs inversus incompleto o situs ambiguus, quando solo alcuni organi si trovano in una posizione invertita, o un organo normalmente laterale diventa mediano). Se si considerano tutti i difetti di lateralizzazione, l'incidenza è circa 1/15.000. La gravità delle malformazioni è molto variabile nell'ambito di una stessa famiglia. Il situs inversus completo non rappresenta in sé un problema rilevante. Al contrario, il si-

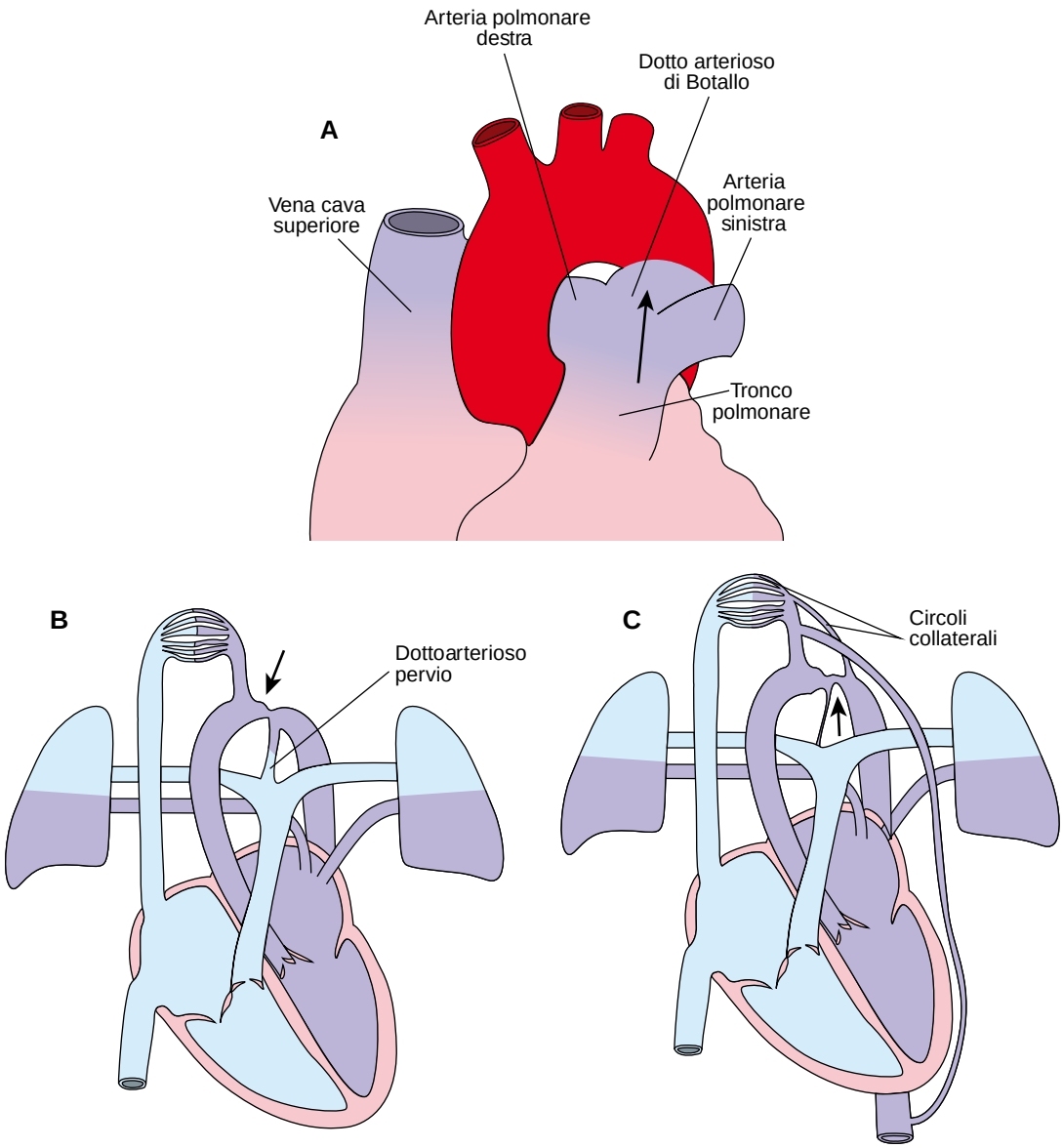



**Figura 17-47** ■ Anomalie arteriose. *A)* Condotto arterioso pervio. *B)* Coartazione aortica preduttale. *C)* Coartazione aortica postduttale.

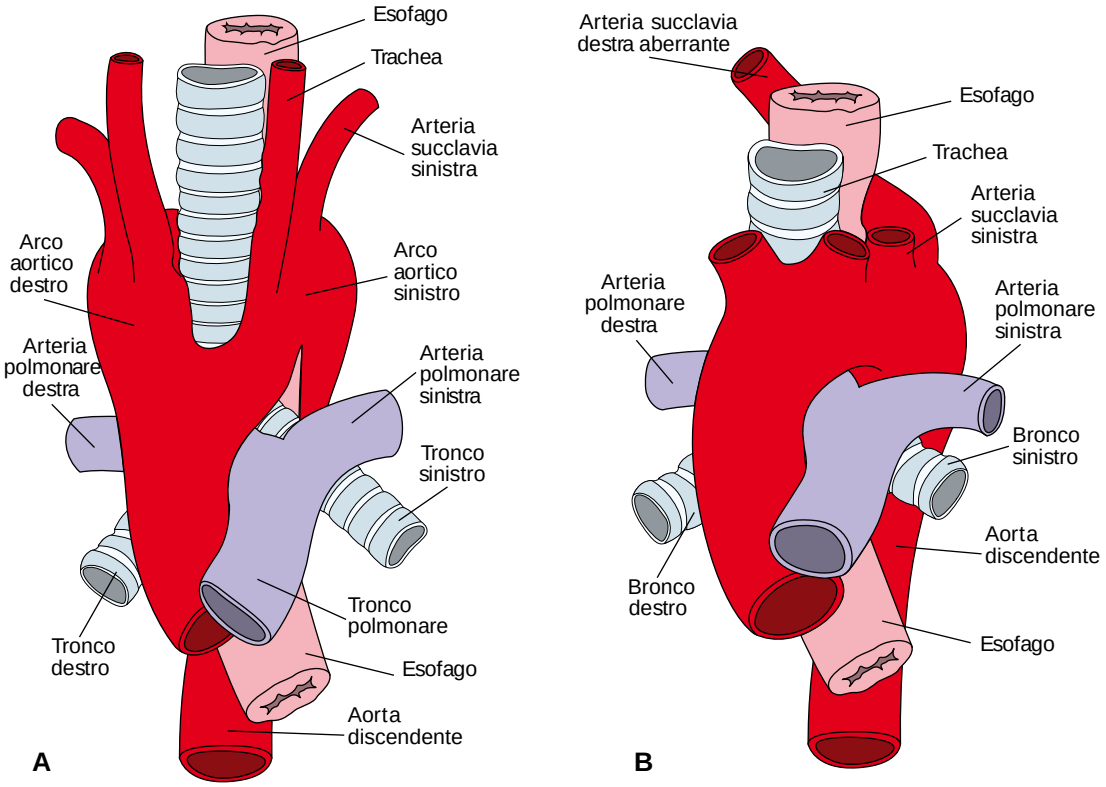



**Figura 17-48** ■ Anomalie arteriose. *A)* Doppio arco aortico. *B)* Arteria succlavia destra aberrante.

tus inversus parziale può essere associato a qualsiasi tipo di malformazione cardiaca o ad anomalie renali, biliari, della linea mediana.

## Difetti del sistema arterioso

Alterazioni delle complesse modificazioni, cui l'albero arterioso va incontro durante lo sviluppo, provocano le più frequenti anomalie che si riscontrano in questo sistema. Le più gravi riguardano i tronchi arteriosi più grossi e più vicini al cuore (Figg. 17-47 e 17-48). Nel **dotto arterioso pervio**, il dotto arterioso non si chiude. Come abbiamo visto, il dotto arterioso dopo la nascita è funzionalmente chiuso, grazie all'attività contrattile della sua parete muscolare. Entro i tre mesi di vita, si ha la chiusura anatomica, per proliferazione delle cellule della tonaca intima del vaso. La sua mancata chiusura può presentarsi come difetto isolato o in combinazione con altri difetti cardiaci. Ad esempio, difetti che provochino grandi differenze tra la pressione aortica e quella polmonare possono provocare un aumento di flusso sanguigno attraverso il dotto, che potrebbe ostacolarne la chiusura. La **coartazione dell'aorta** è una malformazione caratterizzata dal restringimento del lume dell'aorta, al di sotto dell'origine dell'arteria succlavia sinistra. Tale restringimento può avvenire prima dello sbocco del dotto arterioso nell'arco aortico, nel qual caso è definita **coartazione dell'aorta pre-duttale**, e rappresenta l'anomalia più frequente; nella **coartazione dell'aorta post-duttale**, invece, il restringimento si verifica a valle dello sbocco del dotto arterioso. Nel tipo pre-duttale di solito il dotto rimane pervio, mentre in quello post-duttale si oblitera. La causa del restringimento sembra essere dovuta ad un esagerato sviluppo della tunica media accompagnato da aumentata proliferazione delle cellule di quella intima. Il **doppio arco aortico** è un'anomalia dovuta al mancato riassorbimento di parte o di un lungo tratto dell'aorta dorsale di destra. Si forma un anello arterioso che circonda esofago e trachea, comprimendoli e causando problemi di deglutizione e di respirazione. L'**arco aortico destro** si verifica quando il IV arco sinistro e l'aorta dorsale sinistra sono completamente obliterati e vengono sostituiti dai corrispondenti vasi del lato destro. Ciò può provocare difficoltà di deglutizione quando il legamento arterioso passa dietro all'esofago. Un **arco aortico interrotto**, invece, si verifica quando il IV arco aortico nel lato sinistro si oblitera; in genere è associato ad un'origine anomala dell'arteria succlavia destra (**arteria succlavia destra aberrante**).

## Difetti del sistema venoso

Anche nel sistema venoso, anomalie nel complesso sviluppo delle vene cave possono provocare difetti del ritorno venoso. Quando la **vena sacrocardinale sinistra** non perde la sua connessione con quella **sacrocardinale de-**

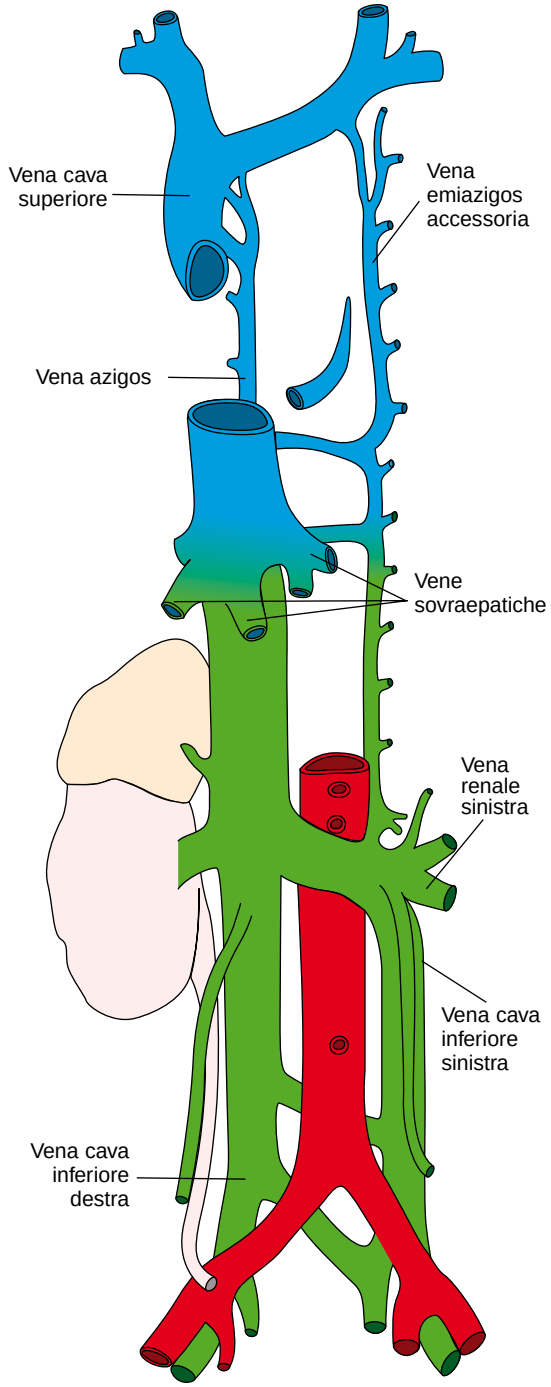



**Figura 17-49** ■ Anomalie del sistema venoso: vena cava inferiore duplice. Il disegno mostra una malformazione caratterizzata dalla parziale duplicazione della vena cava inferiore. La cava soprannumeraria è rappresentata da un grosso canale venoso che mette in comunicazione la vena iliaca comune sinistra con la vena renale dello stesso lato.

**stra**, si forma una **doppia vena cava inferiore** (Fig. 17-49). Invece, quando la **vena sottocardinale destra** non si collega al fegato e scarica il proprio sangue direttamente nella **vena sopracardinale destra**, si verifica l'**assenza della vena cava inferiore.** Di norma questa anomalia è associata ad altre malformazioni cardiache. In alcuni casi la vena cardinale inferiore sinistra persiste mentre quella comune e la porzione prossimale della vena cardinale anteriore destra si obliterano. In tal caso la **vena cava superiore destra** scarica il proprio sangue nell'atrio destro per mezzo del seno coronario. Quando la vena cardinale anteriore sinistra persiste e non si forma la vena brachiocefalica sinistra, si ha una **doppia vena cava superiore.** Come risultato, la vena cava superiore sinistra scarica il proprio sangue nell'atrio destro attraverso il seno coronario.

## Bibliografia citata nel testo e letture consigliate

Antoon FM e coll. Development of the conduction system of the vertebrate heart. In: RPO Harvey, N Rosenthal (eds), Heart development, Academic Press, 1999, pp. 195-207.

Arràez-Aybar LA e coll. Embryonic cardiac morphometry in Carnegie stages 15-23, from the Complutense University of Madrid Institute of Embryology Human Embryo Collection. Cells Tissues Organs 187, 211-220, 2008.

Barbieri M, Carinci P. Embriologia, Casa Editrice Ambrosiana, 1997.

Bentham J, Bhattacharya S. Genetic mechanisms controlling cardiovascular development. Ann NY Acad Sci 1123, 10-19, 2008.

Boudjemline Y e coll. Can we predict 22q11 status of fetuses with tetralogy of Fallot? Prenat Diagn 22, 231-234, 2002.

Christoffels VM e coll. Chamber formation and morphogenensis in the developing mammalian heart. Dev Biol 223, 266-278, 2000.

Clark KL, Yutzey KE, Woodrow Benson D. Transcription factors and congenital heart defects. Annu Rev Physiol 68, 97-121, 2006.

Cochard LR. Atlante di embriologia umana di Netter, Masson-Elsevier, 2002.

Darland DC, D'Amore PA. Blood vessel maturation: vascular development comes of age. J Clin Invest 103, 157-158, 1999.

Darland DC, D'Amore PA. Cell-cell interactions in vascular development. Curr Top Dev Biol 52, 107-149, 2001.

Darland DC, D'Amore PA. TGF beta is required for the formation of capillary-like structures in three-dimensional cocultures of 10T1/2 and endothelial cells. Angiogenesis 4, 11-420, 2001.

Epstein JA e coll. Migration of cardiac neural crest cells in Splotch embryos. Development 127, 1869-1878, 2000.

Gilbert SF, Developmental Biology, 8ª ed, Sinauer Associates, 2006.

Harvey RPO, Rosenthal N. Heart Development, Academic Press, 1999.

Hoogaars WMH, Barnett P, Moorman AFM, Christoffels VM. T-box factors determine cardiac design. Cell Mol Life Sci 64, 646-660, 2007.

Kokubo H, Tomita-Miyagawa S, Hamada Y, Saga Y. Hesr1 and Hesr2 regulate atrioventricular boundary formation in the developing heart through the repression of Tbx2. Development 134, 747-755, 2007.

Lough J. and Sugi Y. Endoderm and heart development, Developmental Dynamycs 217, 237-342, 2000.

Manner J. Cardiac looping in the chick embryo: a morphological review with special reference to terminological and biomechanical aspects of the looping process. Anat Rec 259, 248-262, 2000.

Manner J. Does the subepicardial mesenchyme contribute myocardioblasts to the myocardium of the chick embryo heart? A quail-chick chimera study tracing the fate of the epicardial primordium. Anat Rec 255, 216-223, 1999.

Manner J e coll. The origin, formation and developmental significance of the epicardium: a review. Cells Tissues Organs 169, 89-103, 2001.

Mommersteeg MTM e coll. Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node. Circ Res 100, 354-362, 2007.

O'Rahilly R, Müller F. Human embryology and teratology, Wiley-Liss, 2001.

Rones MS e coll. Serrate and Notch specify cell fates in the heart field by suppressing cardiomyogenesis. Development 127, 3865-3876, 2000.

Rutenberg JB, Fischer A, Jia H, Gessler M, Zhong TP, Mercola M. Developmental patterning of the cardiac atrioventricular canal by Notch and Hairy-related transcription factors. Development 133, 4381-4390, 2006.

Snider P, Olaopa M, Firulli AB, Conway SJ. Cardiovascular development and the colonizing cardiac neural crest lineage. The Scientific World Journal 7, 1090-1113, 2007.

Stennard FA, Harvey RP. T-box transcription factors and their roles in regulatory hierarchies in the developing heart. Development 132, 4897-4910, 2005.

Tuchmann-Duplessis H. Embriologia umana, UTET, 1977.

Wagner M, Siddiqui MA. Signal transduction in early heart development (I): cardiogenic induction and heart tube formation. Exp Biol Med 232, 852-865, 2007.

Wagner M, Siddiqui MA. Signal transduction in early heart development (II): ventricular chamber specification, trabeculation, and heart valve formation. Exp Biol Med 232, 866-880, 2007.

Webb S e coll. Development of the human pulmonary vein and its incorporation in the morphologically left atrium. Cardiol Young 11, 632-642, 2001.

Wessels A e coll. Atrial development in the human heart: an immunohistochemical study with emphasis on the role of mesenchymal tissues. Anat Rec 299, 288-300, 2000.

Xavier-Neto J e coll. Sequential programs of retinoic acid synthesis in the myocardial and epicardial layers of the developing avian heart. Dev Biol 219, 129-141, 2000.

18

# Lo sviluppo dell'apparato locomotore

Massimo De Felici e Marina Bouché

L'apparato locomotore è composto di una parte passiva (**sistema scheletrico**) e di una parte attiva (**sistema muscolare**) che nel loro insieme permettono i nostri movimenti. Tutte le componenti di questo apparato derivano in larga misura dal **tessuto mesenchimale** o **mesenchima** che origina dal mesoderma parassiale (somitomeri e somiti) e dal mesoderma laterale (somatopleura). Un'importante eccezione è rappresentata da numerose ossa e muscoli della faccia e del collo che derivano dall'**ectomesenchima**, ovvero dal mesenchima originato dalle cellule delle **creste neurali**.

## CENNI DI ANATOMIA ED ISTOLOGIA

### Sistema scheletrico

Forma l'impalcatura di sostegno e la parte passiva del sistema locomotore, senza di esso il corpo si affloscerebbe su se stesso e ci muoveremmo come dei molluschi. È formato da **ossa**, **articolazioni** e **legamenti**.

#### Le ossa

Nel corpo umano adulto ci sono all'incirca 208 ossa (Fig. 18-1). Le ossa sono formate da tessuto osseo rivestito da tessuto connettivo (periostio) Il tessuto osseo è formato da:

- quattro tipi di **cellule**, osteoprogenitrici, osteoblasti, osteociti ed osteoclasti;
- una **matrice**, che dà forma ed elasticità all'osso, costituita principalmente da fibre collagene e, in minor misura, di glicoproteine e protoglicani;
- **sali minerali** (principalmente di calcio e fosforo) che danno rigidità e durezza e che si depositano nella matrice.

Per quanto riguarda la forma le ossa vengono divise in lunghe, corte, piatte e irregolari:

- **ossa lunghe** – in esse una dimensione (la lunghezza) prevale nettamente sulle altre. Esempio sono il femore, la tibia, la fibula, l'omero, il radio, l'ulna e le coste;
- **ossa corte** – qui le tre dimensioni più o meno si equivalgono. La forma quindi è approssimativamente cubica. Esempio sono il corpo delle vertebre (Fig. 18-2), l'ossa del carpo o del tarso, la rotula;
- **ossa piatte** – sono ossa a due dimensioni equivalenti (lunghezza e larghezza). Esempio sono le scapole e le ossa craniche;
- **irregolari** – sono invece quelle ossa di forma indefinibile, come lo sfenoide (nel cranio), la parte posteriore delle vertebre e gli ossicini dell'orecchio medio.

In un osso lungo si distinguono le seguenti parti (Fig. 18-3):

- **epifisi** – alle estremità;
- **diafisi** – la parte in mezzo; lunga e più sottile;
- **metafisi** – la zona dove l'osso si assottiglia e la diafisi si continua con l'epifisi. È anche la zona di crescita in lunghezza;
- **spongiosa** costituita da tessuto osseo spugnoso– presente nelle epifisi e nella cavità delle ossa, lamellare a costruzione spugnosa, fatta a rete. Contiene il midollo osseo, dove si formano le cellule sanguigne (Fig. 18-4);
- **compatta** – parte esterna dura e compatta; formata da tessuto osseo lamellare organizzato in osteoni, più consistente nella diafisi (Fig. 18-4).

Anatomicamente si distingue uno scheletro del **cranio**, che può essere ulteriormente suddiviso in **neurocranio** (o parte del cranio che racchiude il cervello) ed in **splancnocranio** (o parte del cranio che racchiude le vie respiratorie e digerenti, in pratica il complesso delle ossa della faccia). Lo scheletro postcraniale si può suddividere nella **parte assile** (o tronco, formato dalla colonna vertebrale, la gabbia toracica e il cinto pelvico e scapolare) e in quella **appendicolare** (ossia gli arti).

#### Le articolazioni e i legamenti

Le articolazioni rappresentano il collegamento tra due ossa. Possono essere di vario tipo e forma. Ve ne sono di

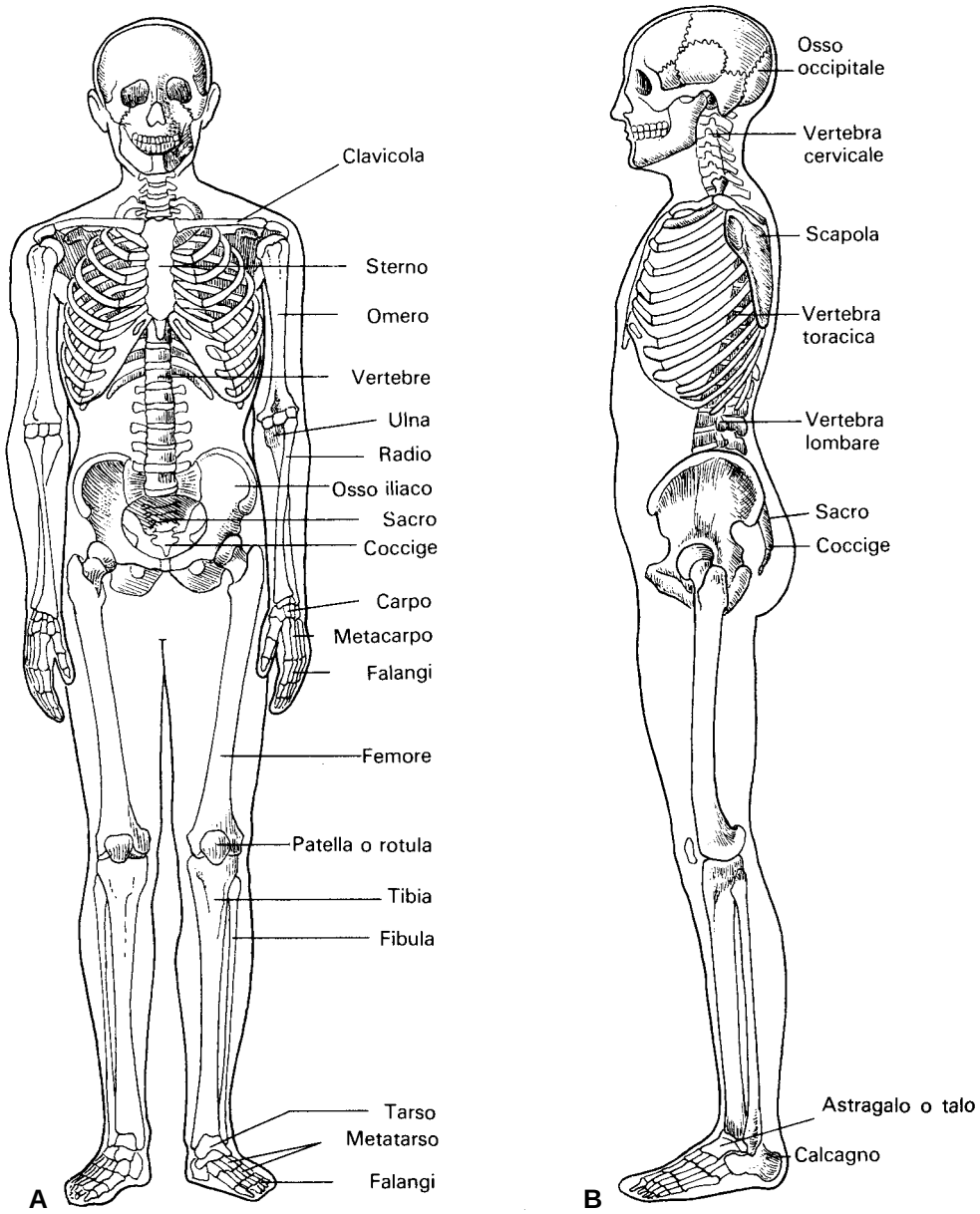



**Figura 18-1** ■ *A)* Lo scheletro umano visto dal davanti. *B)* Lo scheletro umano visto dal lato sinistro, in assenza dell'arto superiore sinistro. (M.A. Miller, A.B. Drakontides, L.C. Leavell, Anatomia e fisiologia di Kimber-Gray-Stackpole, Macmillan Publishing Co., 1985, tr. it. Piccin Nuova Libraria)

fisse o di mobili. Quelle fisse sono per es. quelle che collegano l'osso sacro e le ossa iliache, o lo sterno con le clavicole. Le articolazioni tipiche sono quelle mobili. Esse sono composte da:

- la parte terminale delle ossa (epifisi);
- la cartilagine articolare, attaccata sulle due estremità delle epifisi, molto liscia e con pochissimo attrito, provvista di una certa elasticità;
- la capsula articolare, che chiude l'articolazione e la sinovia al suo interno che produce il liquido sinoviale, molto viscoso, che serve da lubrificante e per nutrimento della cartilagine.

I **legamenti** sono dei fasci di fibre collagene a decorso parallelo che rendono stabile le articolazioni, fissandole in determinate posizioni e rendendo possibili i movimenti solo in certe direzioni ed entro certi limiti. Sono molto resistenti e solidi.

Per la descrizione dell'organizzazione anatomica ed istologica del sistema scheletrico si rimanda ai libri di Anatomia ed Istologia.

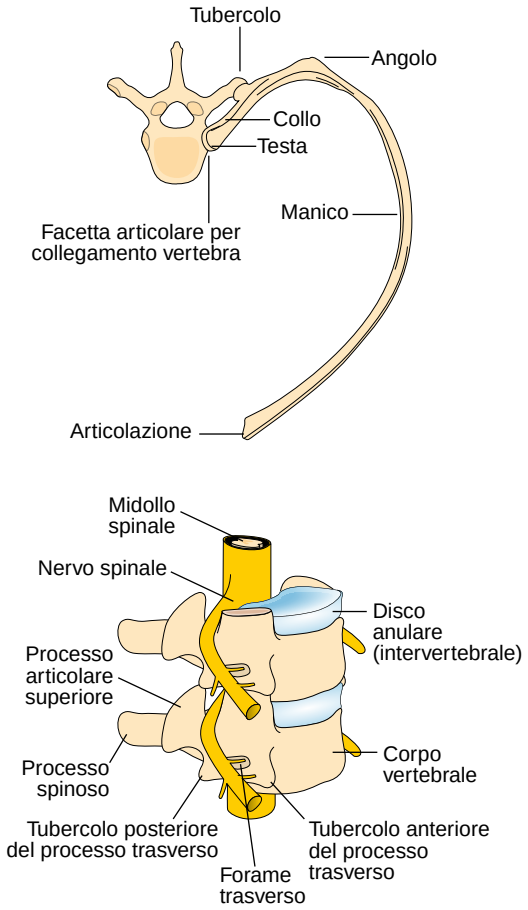



**Figura 18-2** ■ Disegni di una vertebra toracica con costola visti dal basso e di vertebre in visione laterale.

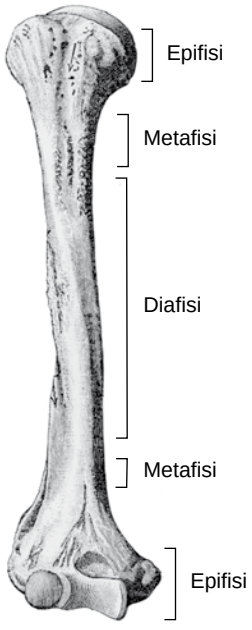



**Figura 18-3** ■ Esempio di osso lungo. (*Da* V. Esposito e coll., Anatomia umana, vol. I, Piccin Nuova Libraria, Padova, 2009.)

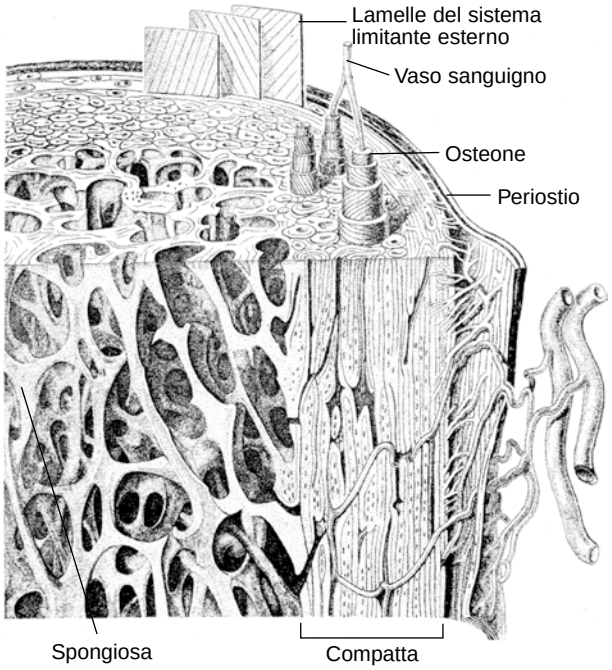



**Figura 18-4** ■ Ricostruzione tridimensionale di un frammento di osso della diafisi di un osso lungo. Notare il rivestimento del periostio, la presenza di lamelle ossee organizzate in osteoni nella regione compatta, mentre nella parte interna è presenta la regione spongiosa. (*Da* A. Benninghoff, K. Goerttler, Trattato di anatomia umana: elaborato con indirizzo anatomo-funzionale, vol. I, Urban & Schwarzenberg, tr. it. Piccin Nuova Libraria, 1980.)

## Sistema muscolare

È la parte attiva dell'apparato locomotore, che fa muovere l'impalcatura formata dallo scheletro. È formato da muscoli (più di 600) (Fig. 18-5), a loro volta formati dalle **fibre** o **cellule muscolari** scheletriche raggruppate in fasci rivestiti ed immersi in tessuto connettivo. Alle fibre sono associate le **cellule satelliti**, piccole cellule fusate con caratteristiche di cellule staminali in grado di proliferare, fondersi e formare nuove fibre muscolari. I muscoli sono collegati alle ossa da strutture simili ai legamenti, chiamati **tendini**. I muscoli scheletrici si contraggono in modo volontario grazie all'innervazione da parte di fibre nervose provenienti da neuroni motori situati nel sistema nervoso centrale.

Per la descrizione dell'organizzazione anatomica ed istologica del sistema muscolare si rimanda ai libri di Anatomia ed Istologia.

## Sviluppo embrionale delle ossa e degli annessi muscoloscheletrici

Nell'embrione la formazione delle ossa avviene seguendo due distinte modalità. Nella prima, cellule mesenchimali si differenziano in osteoblasti che producono tessuto osseo primitivo (non lamellare a fibre collagene intrecciate) che dopo la mineralizzazione viene sostituito da tessuto

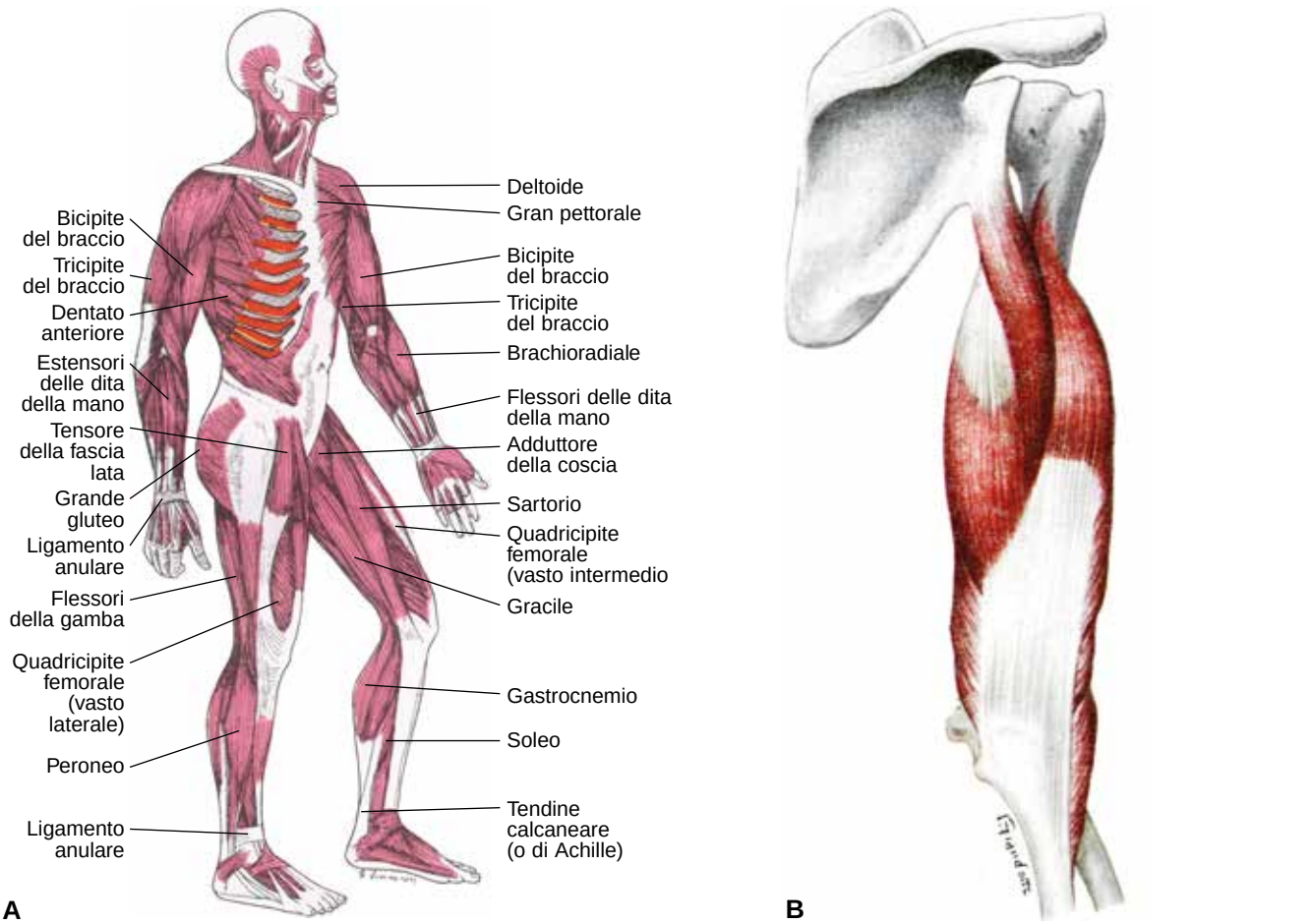
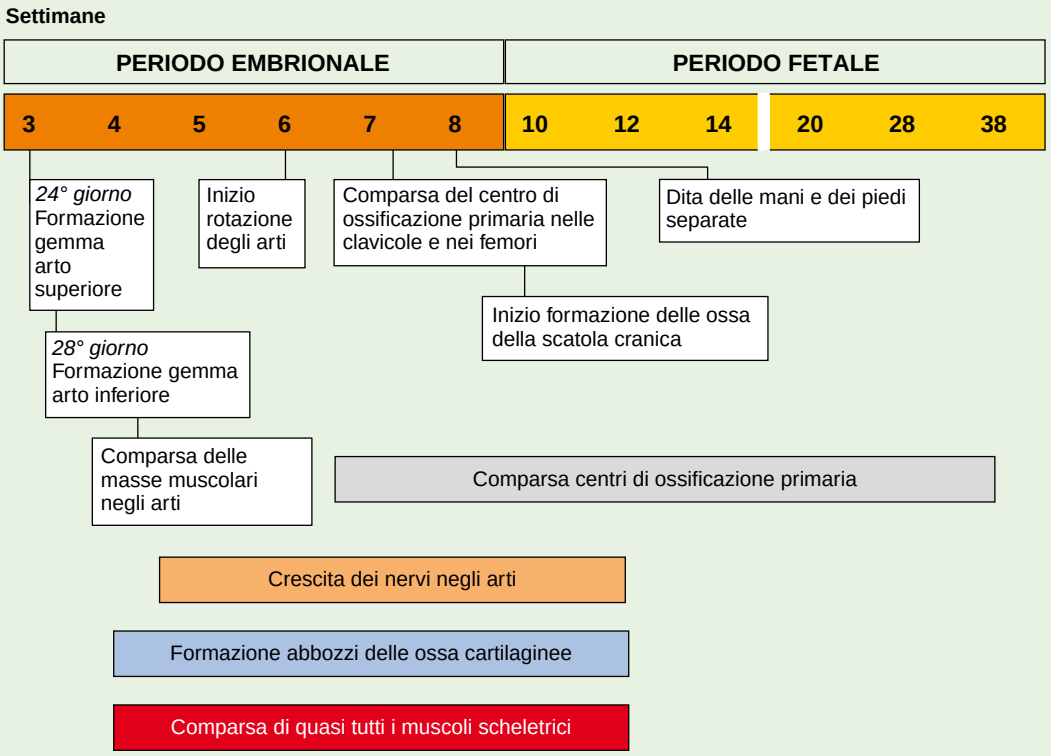



**Figura 18-5** ■ *A)* Principali muscoli del corpo umano (*da* M.A. Miller, A.B. Drakontides, L.C. Leavell, Anatomia e fisiologia di Kimber-Gray-Stackpole, Macmillan Publishing Co., 1985, tr. it. Piccin Nuova Libraria). *B)* Il muscolo tricipite (*da* G. Chiarugi, L. Bucciante, Istituzioni di anatomia dell'uomo. Testo-atlante, vol. 2, Piccin Nuova Libraria, Padova, 1983).

osseo definitivo (lamellare a fibre collagene parallele). Questo tipo di ossa sono dette **ossa membranose** e il processo di ossificazione è chiamato **ossificazione diretta** o **intramembranosa** (Fig. 18-6). Nella seconda modalità, le cellule mesenchimali si differenziano in condroblasti che formano tessuto cartilagineo. In questo modo le ossa sono abbozzate sotto forma di cartilagine che verrà successivamente sostituita da tessuto osseo primitivo e quindi definitivo. Le ossa che si formano con tale modalità sono dette **ossa cartilaginee** o **di sostituzione** ed il processo di ossificazione è chiamato **ossificazione indiretta** o **endocondrale** o **condrale** (Tab. 18-1). Per i particolari istologici di tali processi si rimanda ai libri di Istologia. Dei meccanismi molecolari che regolano questi processi si tratterà nel paragrafo "Processi e molecole". Le cellule mesenchimali che danno origine alle ossa derivano dal mesoderma parassiale dei somiti (sclerotomo), dal mesoderma della placca precordale, dal mesoderma laterale somatico e dalle cellule delle creste neurali a seconda della regione del corpo, come verrà descritto più avanti.

I muscoli scheletrici derivano anch'essi dalle regioni di mesoderma sopra descritte. Per quanto riguarda i somiti, le cellule che daranno origine alla muscolatura scheletrica derivano da una loro regione chiamata **miotomo**. Le cellule destinate a differenziarsi in cellule muscolari embrionali sono chiamate **mioblasti**. Questi sono cellule mononucleate che proliferano, si raggruppano, aderiscono e si fondono tra loro, dando origine ai **miotubi**, cellule polinucleate cilindriche. La fusione dei mioblasti è un processo pressoché unico dello sviluppo embrionale e il miotubo che si origina da tale processo è noto in biologia come **sincizio cellulare**, ovvero una cellula con decine di nuclei ospitati in un unico citoplasma, derivata dalla fusione di cellule singole (Fig. 18-7). Quando il citoplasma del miotubo si riempie di strutture contrattili chiamate **miofibrille**, i nuclei vengono spinti alla periferia del citoplasma e la cellula si è ora differenziata in una **fibra** o **cellula muscolare scheletrica**. Le miofibrille sono costituite da **miofilamenti di actina** e **miosina** disposti all'interno di unità strutturali e funzionali chiamate **sarcomeri** che conferiscono alla cellula una tipica striatura trasversale. Il sarcomero rappresenta la base strutturale della capacità di contrazione della fibra muscolare scheletrica. I primi miotubi si formano intorno alla 5ª settimana e, alla fine dell'8ª settimana, la maggior parte dei miotubi è differenziata in fibre muscolari. Tra le fibre, cellule mesenchimali

## TABELLA CRONOLOGICA DEI PRINCIPALI PROCESSI DI SVILUPPO DELL'APPARATO LOCOMOTORE



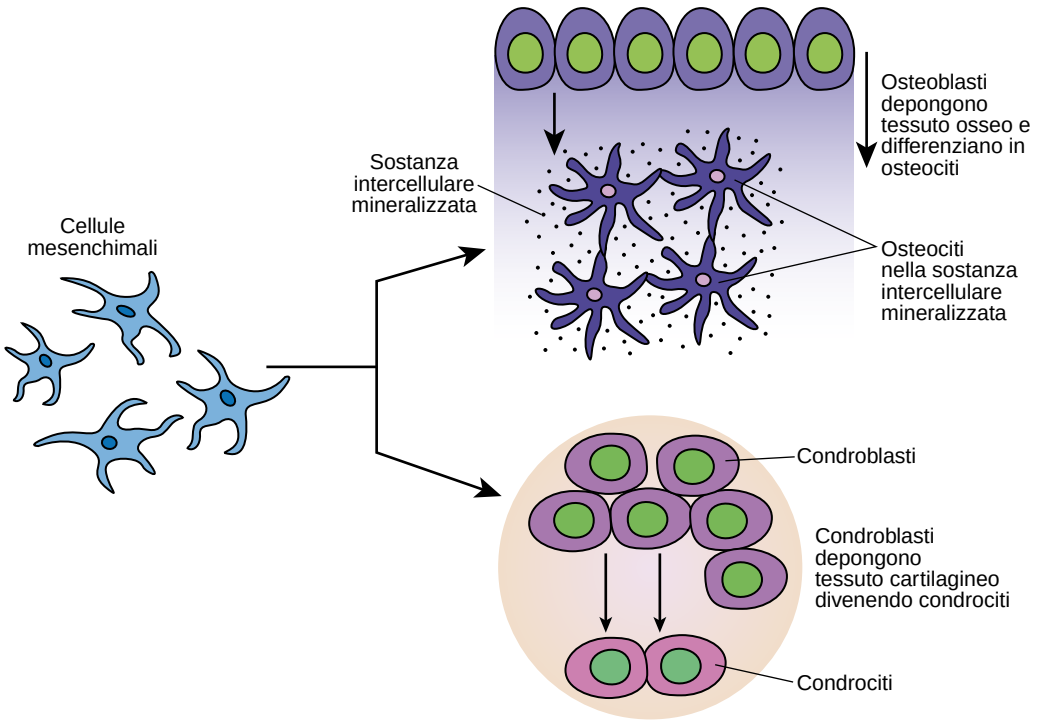




**FIGURA 18-6** ■ Schema della formazione di ossa membranose e cartilaginee.

**TABELLA 1**
Ossa membranose e cartilagine

| Ossa membranose | | | Ossa cartilaginee | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Neurocranio** | **Splancnocranio** | **Scheletro assile** | **Neurocranio (condrocranio)** | **Splancnocranio** | **Scheletro assile ed appendicolare** |
| Frontale | Mandibole | Clavicole | Sfenoide | Ossa nasali<br>Lacrimali | Pressoché tutte le ossa |
| Parietali | Mascelle | | Etmoide | Alisfenoide | |
| Squama occipitali | Squama temporale | | Base occipitali | Ossicini orecchio medio | |
| | Zigomatici | | Rocca petrosa temporali | Ioide | |

che non differenziano in mioblasti diventano cellule satelliti (Fig. 18-7). Per la descrizione della dettagliata struttura delle fibre muscolari scheletriche e del processo di contrazione si rimanda ai libri di Istologia.

## Scheletro assile e muscoli annessi

La prima struttura del sistema scheletrico che si forma è la **notocorda**. Essa appare nella linea mediana del disco embrionale intorno al 15° giorno di sviluppo come una proliferazione di cellule che originano da una piccola depressione (**fossetta primitiva**) situata in corrispondenza del rilievo dell'ectoderma noto come **nodo di Hensen** all'estremità della **linea primitiva**. Il processo di formazione della notocorda è descritto in dettaglio nel Capitolo 10 e viene riassunto in questa sezione perché rilevante per la formazione degli apparati trattati. Esso avviene durante la gastrulazione, pressoché contemporaneamente alla formazione del mesoderma intraembrionale. Durante la proliferazione, le cellule della notocorda si portano sotto l'ectoderma e formano un tubicino chiamato **processo notocordale**. Questo si dispone dietro la **placca precordale**; Dal mesoderma della placca precordale deriva il mesenchima cefalico che forma parte dei connettivi e dei muscoli della faccia. Durante i 5-6 giorni seguenti il processo notocordale si modifica prima in **placca notocordale** e quindi nella **notocorda definitiva**. La placca notocordale si forma a seguito della fusione tra la parete ventrale del processo notocordale e l'endoderma definitivo sottostante appena formato. Gli strati che si sono fusi degenerano, formando un'apertura temporanea nel pavimento del processo notocordale che mette in comunicazione il canale della notocorda con il sacco vitellino (**canale neuroenterico**). A partire dall'estremità craniale, le cellule della notocorda proliferano e la piastra notocordale si ripiega ventralmente; le due pieghe si uniscono a formare la notocorda vera e propria, un cordoncino di cellule, detto notocorda definitiva o corda dorsale, che alla fine, verso il 22°-24° giorno, si staccherà dall'endoderma.

La notocorda segna l'asse mediano dell'embrione e svolge un ruolo primario nell'indirizzare le cellule dell'ectoderma sovrastante a differenziare in neuroectoderma e le cellule dei vicini somiti a differenziare nello sclerotomo mediante molecole come cordina, noggina RA e SHH (Figg. 18-8 e 18-9).

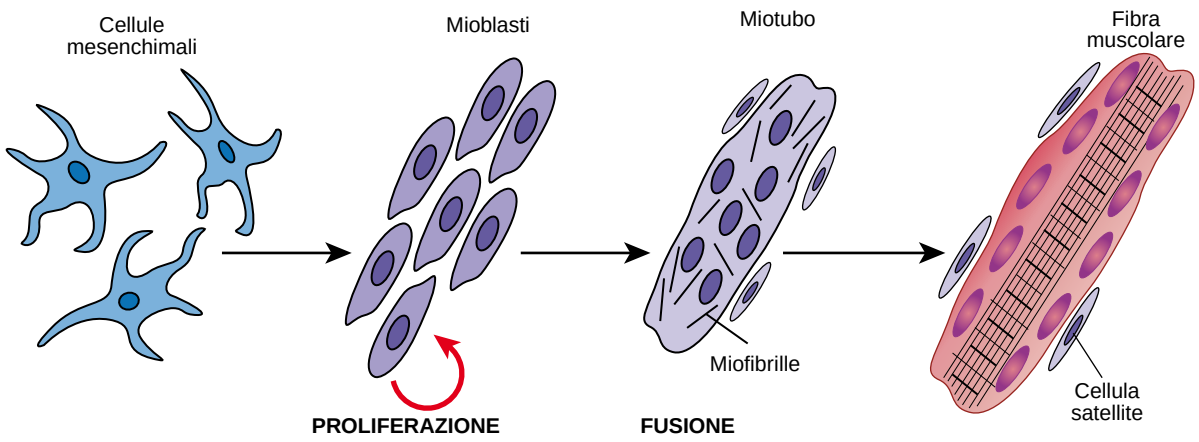



**FIGURA 18-7** ■ Schema del differenziamento di cellule mesenchimali in fibre muscolari scheletriche.

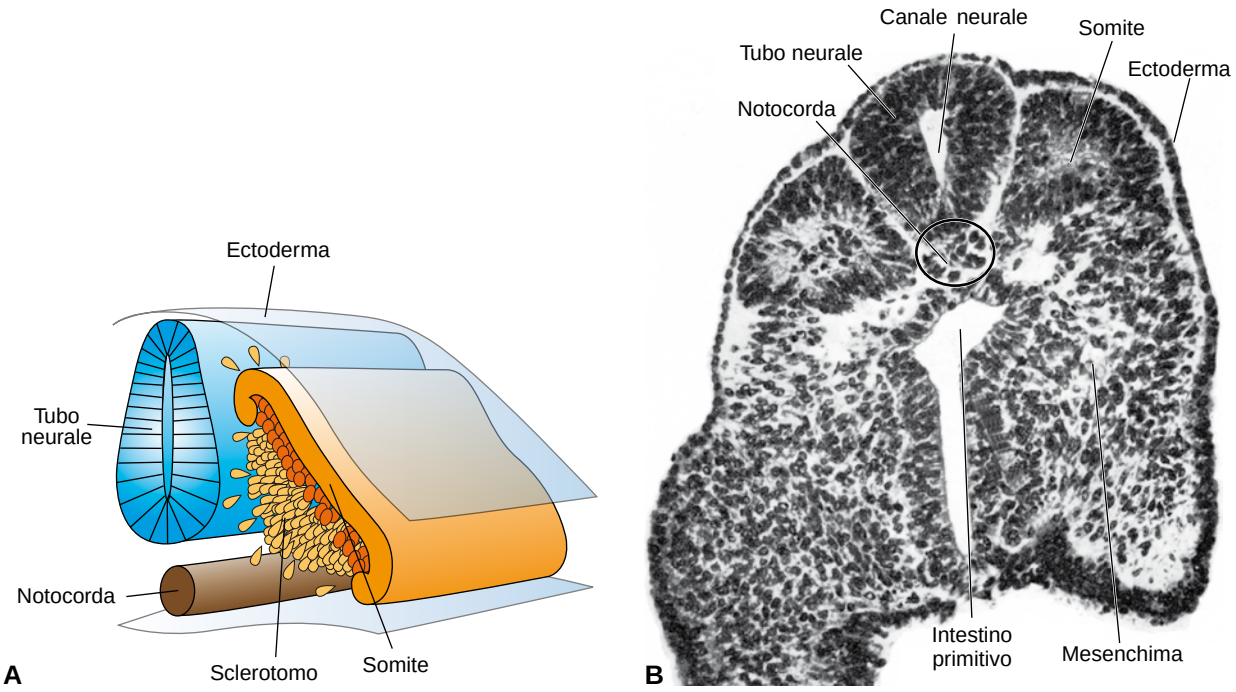



**Figura 18-8** ■ *A)* Schema della formazione dello sclerotomo dalla regione latero-mediana del somite. *B)* Fotografia al microscopio elettronico a scansione della stessa regione (*da* W.J. Hamilton, J.D. Boyd, H.W. Mossman, Embriologia umana, Piccin Nuova Libraria, Padova, 1977).

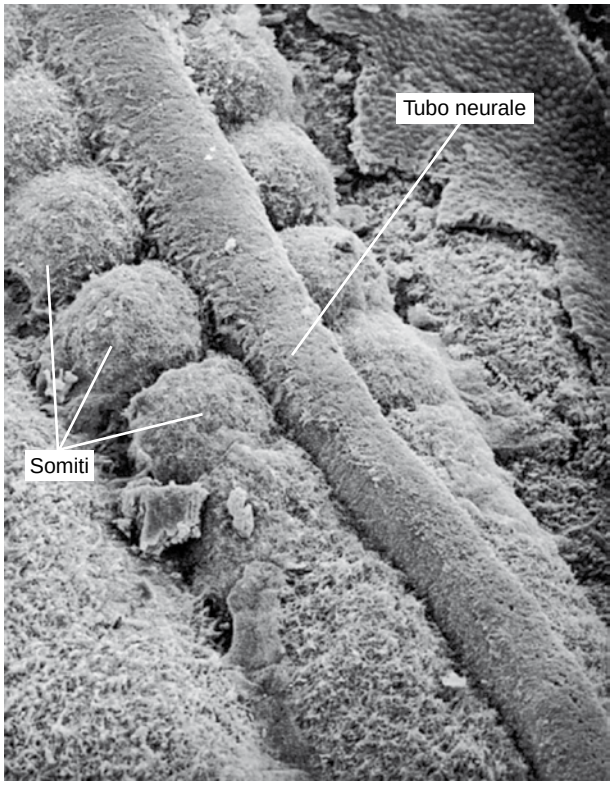



**Figura 18-9** ■ Fotografia al microscopio elettronico a scansione del tubo neurale con ai lati i somiti in via di formazione. (Per gentile concessione di Kathryn W. Tosney.)

Lo sclerotomo di ciascun somite si addensa intorno alla notocorda e al tubo neurale (Fig. 18-10). Quello intorno alla notocorda si divide in una metà craniale e una metà caudale. La metà caudale di ciascun sclerotomo fonde con la metà craniale dello sclerotomo successivo formando il **centro mesenchimale**, il primordio del **corpo cartilagineo della vertebra** (Fig. 18-11). In questo modo il corpo di ogni vertebra si sviluppa da due sclerotomi adiacenti e diviene una struttura intersegmentale. Una parte delle cellule della metà craniale di ogni sclerotomo non si fonde con la metà caudale e forma i **dischi intervertebrali**. La notocorda circondata del corpo delle vertebre in formazione degenera, mentre a livello dei dischi intervertebrali permane e si espande per formare il **nucleo polposo**. Questo viene successivamente circondato da cartilagine fibrosa che forma l'**anello fibroso** del disco intervertebrale. I miotomi di ciascun somite si sovrappongono a ciascun disco intervertebrale consentendo ai muscoli che ne originano (**muscoli vertebrali**) di poter muovere la colonna. I nervi provenienti dal tubo neurale si trovano ora in stretta relazione con i dischi intervertebrali e in questo modo possono fuoriuscire dalla colonna attraverso i **forami intervertebrali**. Le **arterie intersegmentali**, derivate dall'aorta dorsale, si trovano invece a ciascun lato dei corpi vertebrali.

Le cellule dello sclerotomo che circondano il tubo neurale si organizzano per formare l'**arco vertebrale** che si fonde con il corpo di ciascuna vertebra. In questo modo il midollo spinale viene racchiuso all'interno

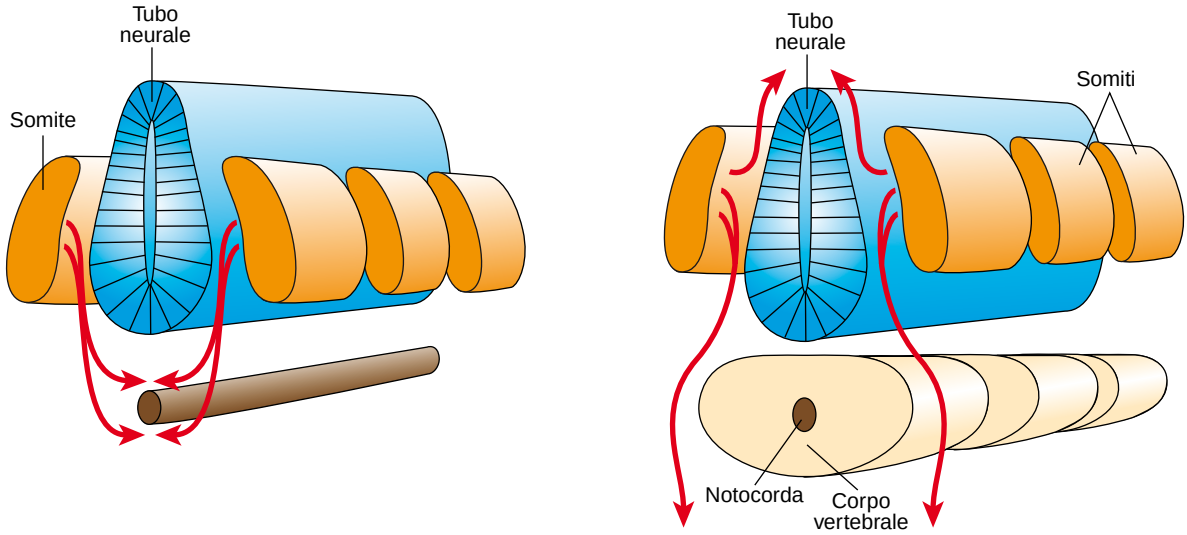



**Figura 18-10** ■ Schema della formazione del corpo e dell'arco delle vertebre dalle cellule dello sclerotomo che migrano intorno alla notocorda.

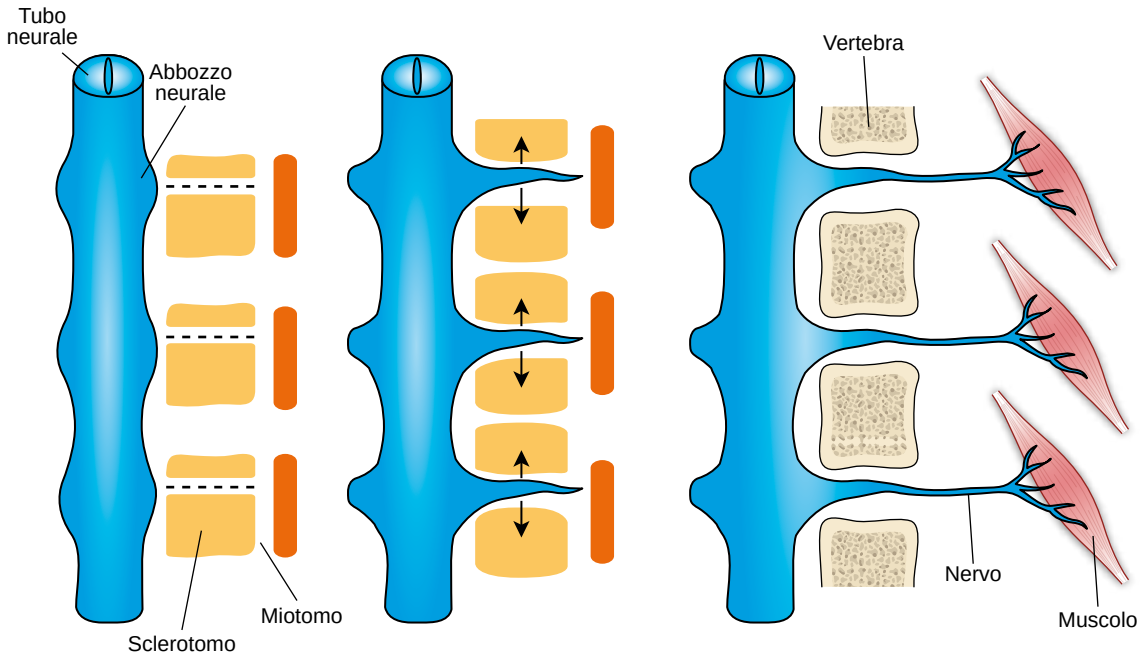



**Figura 18-11** ■ Schema della fusione della regione caudale e craniale di sclerotomi adiacenti che porta alla formazione del corpo delle vertebre. Notare i nervi che passano tra i corpi vertebrali all'altezza dei dischi intervertebrali e i muscoli all'altezza dei corpi vertebrali.

del **canale vertebrale** (Fig. 18-12). Le **coste** o **costole** originano dai **processi costali** delle vertebre toraciche. Nelle vertebre prive di articolazioni costali, i processi costali contribuiscono alla formazione dei processi trasversi delle vertebre e allo sviluppo delle ali laterali del sacro (Fig. 18-13). L'atlante (c1) e l'epistrofeo (c2) differiscono dalla vertebre tipiche per il fatto che il corpo dell'atlante si fonde al corpo dell'epistrofeo per formare il processo odontoideo sui cui si articola la base del cranio.

Lo **sterno** si sviluppa indipendentemente dal mesoderma somatico della parete ventrale del corpo. Due lamine sternali si formano ai lati della linea mediana e successivamente si fondono per formare gli abbozzi car-

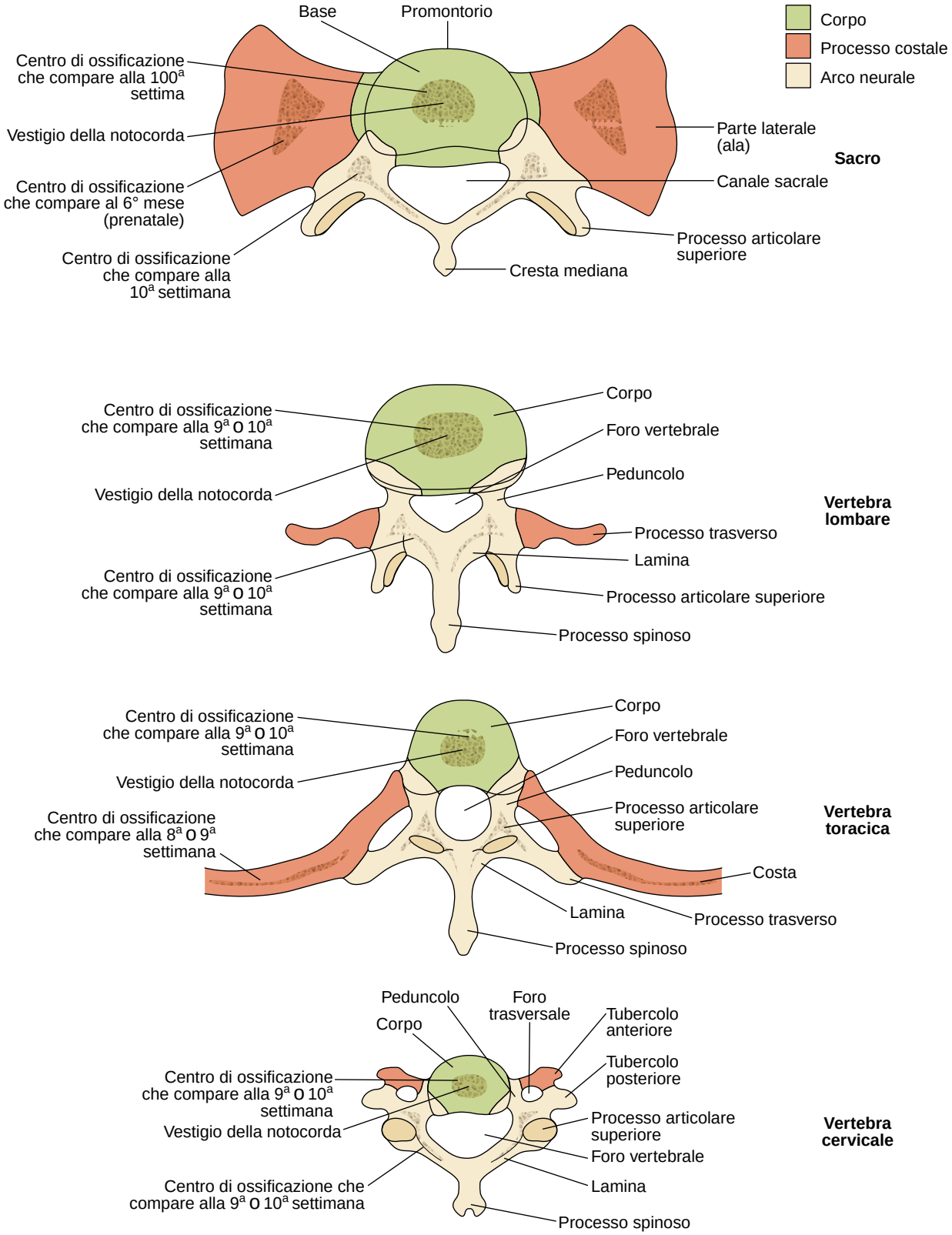



**FIGURA 18-12** ■ *A)* Disegno della formazione di vertebre in quattro regioni della colonna: cervicale, toracica, lombare e sacrale.

*(La figura continua a pagina seguente)*

**Figura 18-12** *(Continuazione)* ■ *B)* Sezione trasversale di un embrione che mostra la formazione della cartilagine di una vertebra, colorata in celeste, intorno al tubo neurale.

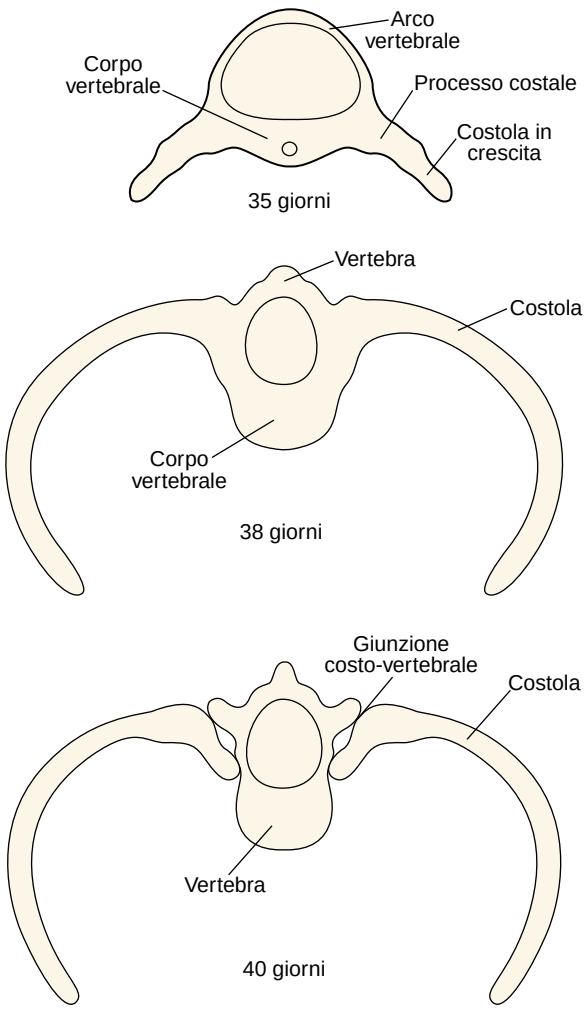



**Figura 18-13** ■ Disegno che illustra la formazione delle coste.

tilaginei del manubrio, dei segmenti del corpo (sternebri) e del processo xifoideo (Fig. 18-14).

Le ossa membranose della scatola cranica e della faccia si formano tra la 9ª e la 12ª settimana. Le clavicole sono le ossa membranose che iniziano ad ossificare per prime (5ª-6ª settimana). Le ossa cartilaginee cominciano ad andare incontro ad ossificazione (comparsa del centro di ossificazione primario) intorno alla 7ª settimana. Il primo osso in cui compare il centro di ossificazione primario è il femore. L'ultimo osso cartilagineo in cui compare il centro di ossificazione primario prima della nascita è l'osso ioide (36ª settimana). Alcune delle più piccole ossa del carpo della mano e del tarso del piede iniziano ad ossificare solo durante la prima infanzia. I centri di ossificazione secondaria compaiono in tutte le ossa dopo la nascita.

Dopo cinque settimane è presente nell'embrione una coda molto pronunciata contenente le vertebre coccigee. La coda è nascosta dalle natiche ed in seguito regredisce per diventare il coccige.

La muscolatura associata allo scheletro assile origina principalmente dalla regione dei somiti chiamata **miotomo**. Alla fine della 5ª settimana le cellule derivate dai miotomi di tutti i somiti sono raggruppate in una piccola regione dorsale chiamata **epimero** ed una più ampia latero-ventrale chiamata **ipomero** (Fig. 18-15). Da queste masse cellulari si formeranno via via tutti i muscoli associati allo scheletro assile. Alla fine dell'8ª settimana sono ormai presenti quasi tutti i muscoli scheletrici dello scheletro assile.

## Scheletro appendicolare e muscoli annessi

Lo scheletro appendicolare è formato dai cingoli toracico e pelvico e dagli arti. Gli abbozzi di queste strutture compaiono come piccole estroflessioni a forma di pinna della parete ventro-laterale del corpo, alla fine della 4ª settima-

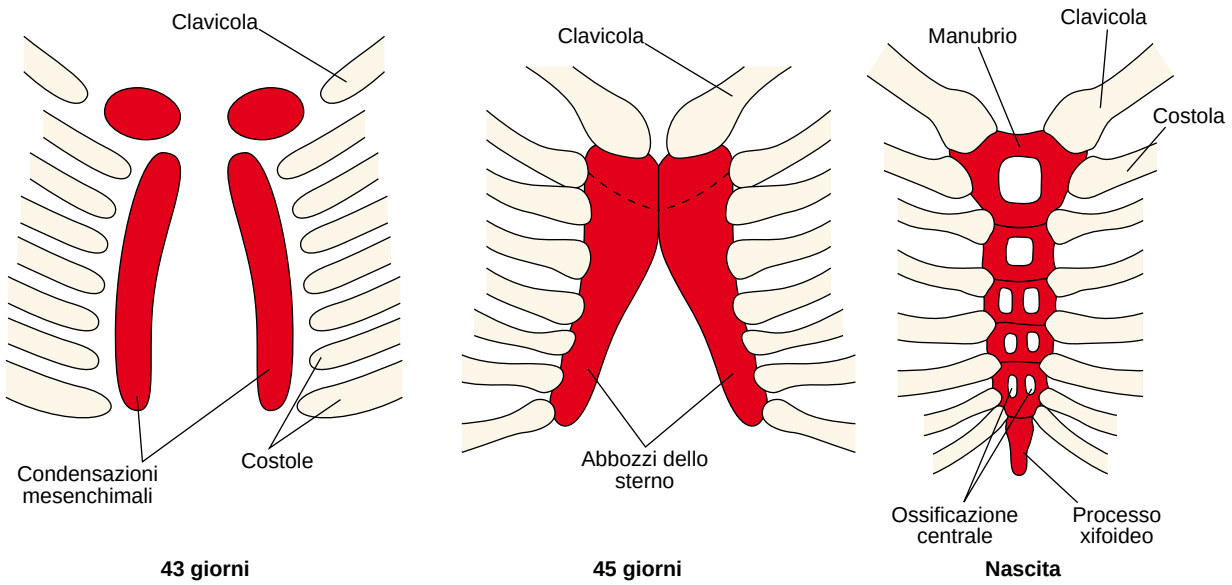



**Figura 18-14** ■ Disegno che illustra la formazione dello sterno.

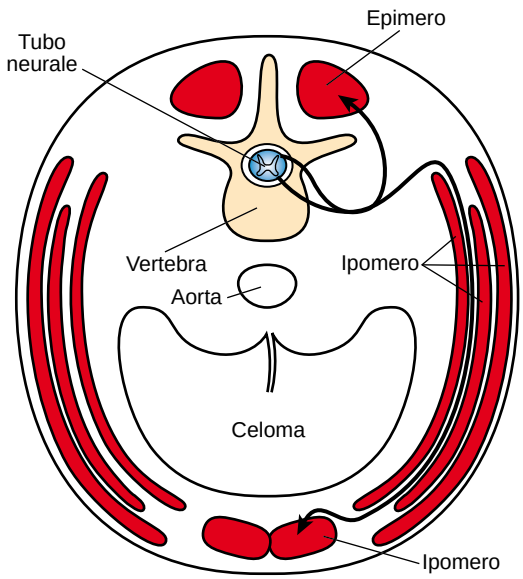



**Figura 18-15** ■ Migrazione delle cellule del miotomo dei somiti con formazione delle masse di mioblasti dell'epimero e dell'ipomero. Le frecce indicano il processo d'innervazione che parte dal midollo spinale derivato dal tubo neurale e si dirige nel lato sinistro del tronco.

na di sviluppo. Gli abbozzi degli arti superiori compaiono per primi (24° giorno), seguiti da quelli degli arti inferiori da uno a quattro giorni dopo (25°-28° giorno). All'inizio essi sono formati da un nucleo mesenchimale, derivato dalla somatopleura del mesoderma laterale, che darà origine allo scheletro ed al tessuto connettivo dell'arto, rivestito da uno strato ectodermico di cellule cubiche (**cresta ectodermica apicale**, **CEA**). Alla fine dell'8ª settimana, abbozzi di cartilagine già ben modellati formano tutte le future ossa maggiori dello scheletro degli arti.

Durante la 5ª settimana cellule mesenchimali dei miotomi dei somiti invadono le gemme degli arti e formano due ampi addensamenti, uno dorsale ed uno ventrale rispetto al mesenchima assile. Le cellule di questi addensamenti formano i mioblasti che verso la fine della 5ª settimana si fondono tra loro e cominciano a formare miotubi. La massa muscolare dorsale dà origine, in generale, ai muscoli estensori e supinatori degli arti superiori e a quelli estensori e abduttori degli arti inferiori. La massa muscolare ventrale dà origine ai muscoli flessori e pronatori degli arti superiori e a quelli flessori e adduttori degli arti inferiori (Figg. 18-16 e 18-17).

Nel corso del loro sviluppo gli arti subiscono **importanti rotazioni**. A sei settimane gli arti ruotano ante-

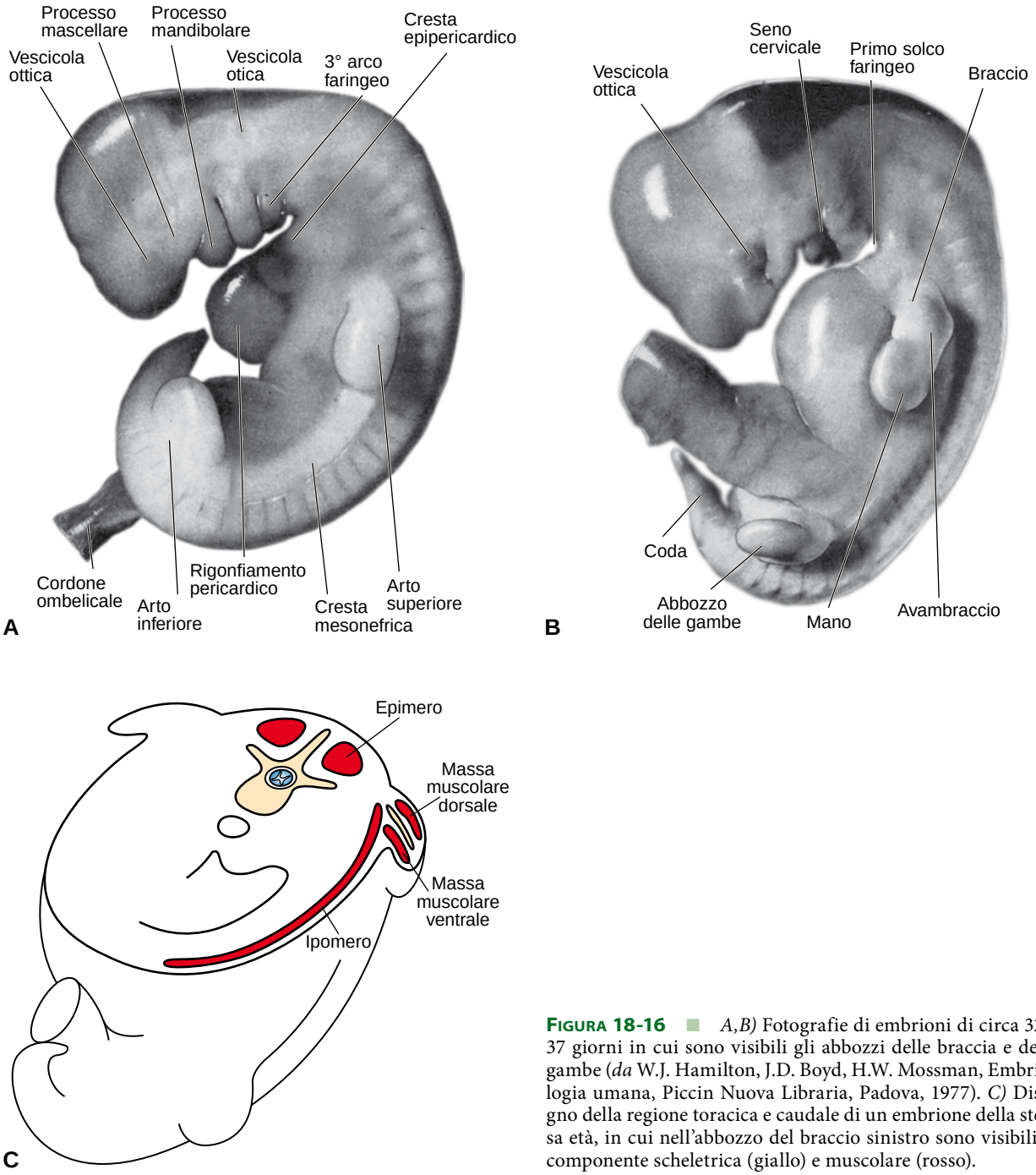



**Figura 18-16** ■ *A,B)* Fotografie di embrioni di circa 32 e 37 giorni in cui sono visibili gli abbozzi delle braccia e delle gambe (*da* W.J. Hamilton, J.D. Boyd, H.W. Mossman, Embriologia umana, Piccin Nuova Libraria, Padova, 1977). *C)* Disegno della regione toracica e caudale di un embrione della stessa età, in cui nell'abbozzo del braccio sinistro sono visibili la componente scheletrica (giallo) e muscolare (rosso).

riormente; così i gomiti e le ginocchia sono diretti lateralmente, le palme e le piante sono diretti verso il tronco. A sette settimane gli arti hanno subito una torsione di 90° sul loro asse longitudinale, ma in direzione opposte; ora i gomiti sono rivolti caudalmente e le ginocchia cranialmente. A otto settimane la torsione degli arti inferiori ha come risultato una rotazione della loro innervazione cutanea (Fig. 18-18).

## Ossa e muscoli della testa

Come abbiamo visto il cranio può essere suddiviso in due regioni: il **neurocranio** che forma un involucro protettivo attorno all'encefalo e lo **splancnocranio** che costituisce lo scheletro della faccia (Fig. 18-19). Conviene suddividere anche il neurocranio in due regioni: la **porzione membranosa**, costituita da ossa che formano la volta del cranio, e la porzione cartilaginea o **condrocranio**, che

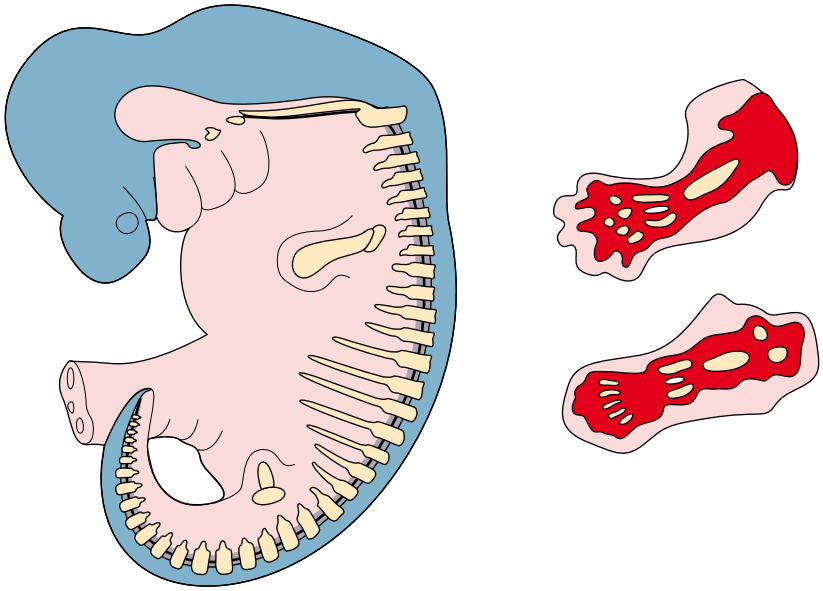


**Figura 18-17** ■ A sinistra, abbozzi cartilaginei dello scheletro assile (vertebre e costole) ed appendicolare (arti superiori ed inferiori) alla 5ª settimana. A destra arto superiore ed inferiore a sei settimane, sono visibili gli abbozzi cartilaginei (in giallo) delle principali ossa, circondati dalle masse muscolari (in rosso).

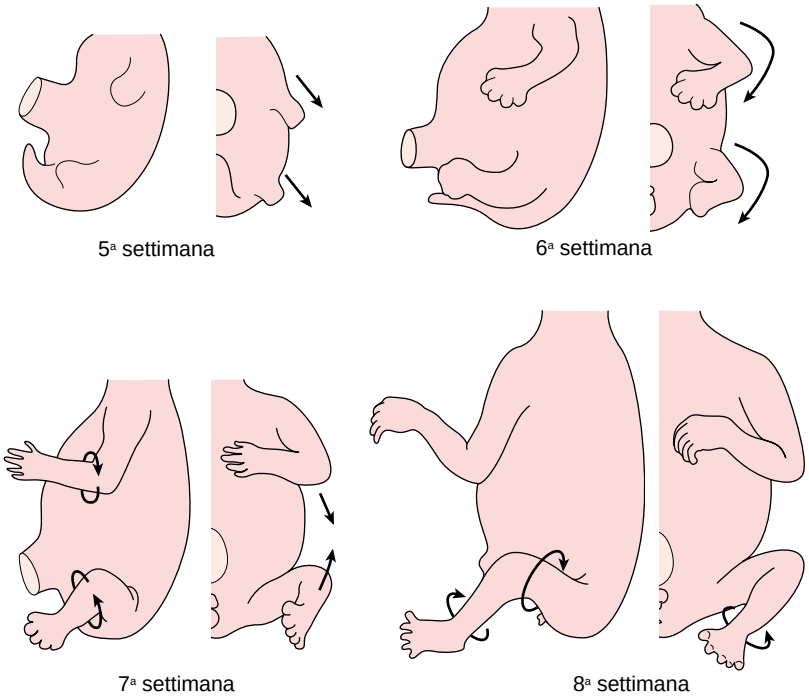



**Figura 18-18** ■ Rotazione degli arti superiori ed inferiori tra la 5ª e 8ª settimana.

forma le ossa della base cranica. La porzione membranosa (frontale, parietali e squama occipitali) deriva dall'ectomesenchima delle creste neurali e dal mesoderma parassiale dei somitomeri e dei somiti. Le ossa della volta ossificano direttamente, ma non completano il loro accrescimento. Le **suture** di tessuto connettivo situato tra di esse non ossificano e permettono al cranio di deformarsi mentre passa attraverso il canale del parto e di proseguire poi ad accrescersi dopo la nascita fino a 5-7 anni. Nei punti dove si incontrano più ossa le suture so-

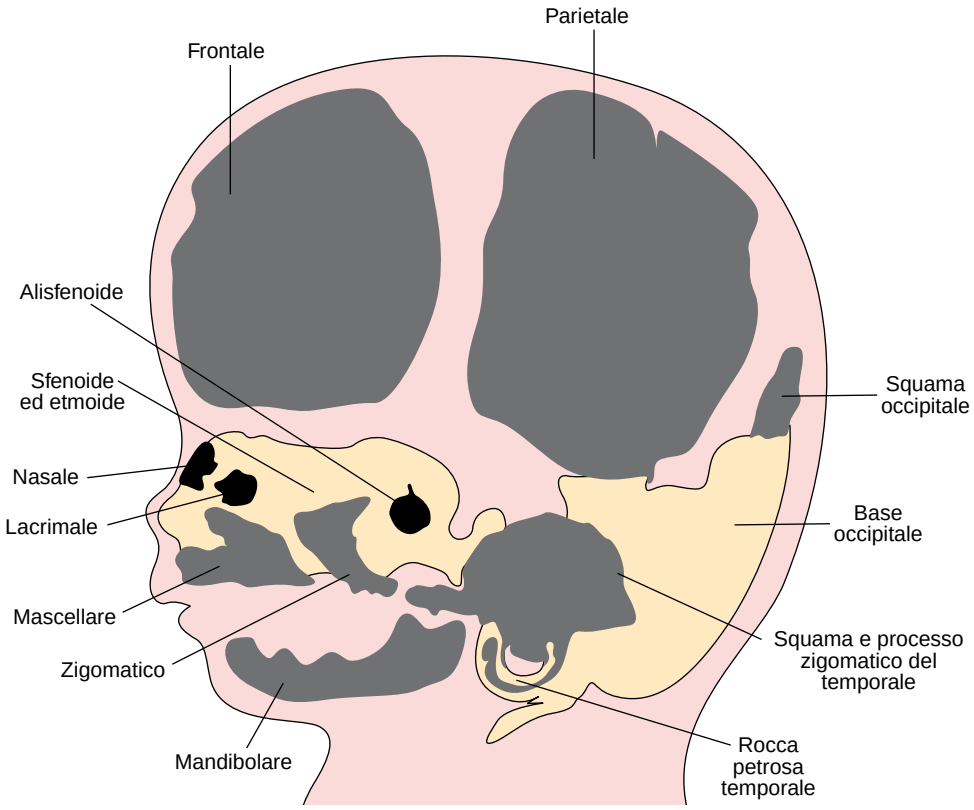



**Figura 18-19** ■ Ossa membranose del neurocranio e dello splancnocranio (grigio) e ossa cartilaginee del condrocranio (giallo) della testa di un feto intorno alla 12ª settimana. In nero, centri di ossificazione endocondrale delle ossa indicate.

no ampie e formano le **fontanelle**. Il condrocranio consiste inizialmente di un certo numero di ossa cartilaginee separate originatesi anche esse dalle creste neurali e dal mesoderma parassiale. Quando queste cartilagini si fondono e ossificano per ossificazione endocondrale, si costituisce la base cranica (sfenoide, etmoide, base occipitale e rocca petrosa temporale). Lo splancnocranio è costituito dalle ossa della faccia e deriva principalmente dagli elementi scheletrici dei primi due archi faringei originati dalle creste neurali. Dal I arco originano dorsalmente i **processi mascellari** e ventralmente i **processi mandibolari**. Dai primi si sviluppano le ossa mascellari, zigomatiche e la squama delle ossa temporali, tutte ossa membranose (ossificazione diretta). I processi mandibolari, sono inizialmente formati dalla cartilagine di Meckel. Mentre questa scompare, le cellule mesenchimali circostanti formano la mandibola (ossificazione diretta) e le ossa cartilaginee incudine e martello (orecchio interno) e alisfenoide. Anche il secondo arco (arco ioideo) è inizialmente formato da cartilagine (cartilagine di Reichert). Questa darà origine alla staffa (orecchi interno), rocca petrosa (con processo stiloideo) dei temporali, al piccolo corno e parte superiore dell'osso ioide, tutte ossa cartilaginee (vedi anche Capitolo 14).

Tutti i muscoli scheletrici della testa e del collo derivano dal mesoderma parassiale (somitomeri e somiti), compresi i muscoli della lingua, quelli oculari (eccetto quelli dell'iride, derivati dall'ectoderma del calice ottico) e quelli associati agli archi faringei. Da menzionare il probabile contributo da parte del mesoderma della placca precordale e delle cellule delle creste neurali.

## PROCESSI E MOLECOLE

### *L'istogenesi dell'osso*

#### *La determinazione delle cellule osteogeniche*

La formazione degli elementi scheletrici durante l'embriogenesi, come anche il rimodellamento dinamico dell'osso durante la vita adulta, coinvolge l'interazione fra segnali ambientali, vie di segnalazione intra-cellulari, fattori di trascrizione e co-regolatori (ad es., vitamine ed ormoni) che sostengono il differenziamento di cellule mesenchimali verso l'osteocita maturo dell'osso mineralizzato (Fig. 18-20). Il differenziamento delle cellule mesenchimali in condroblasti o osteoblasti richiede come al solito una serie di induzioni da parte di diverse molecole. Le cellule mesenchimali dello sclerotomo sono inizialmente indotte da una serie di segnali tra cui in particolare quelli da parte del fattore di crescita **SHH** (sonig hedgehog). Il destino osteogenico di queste cellule è rafforzato da segnali da parte di membri della famiglia dei **BMP** (bone morphogenetic factor) **2, 4** e **7**, prodotti da cellule e tessuti circostanti. Nelle cellule mesenchimali destinate

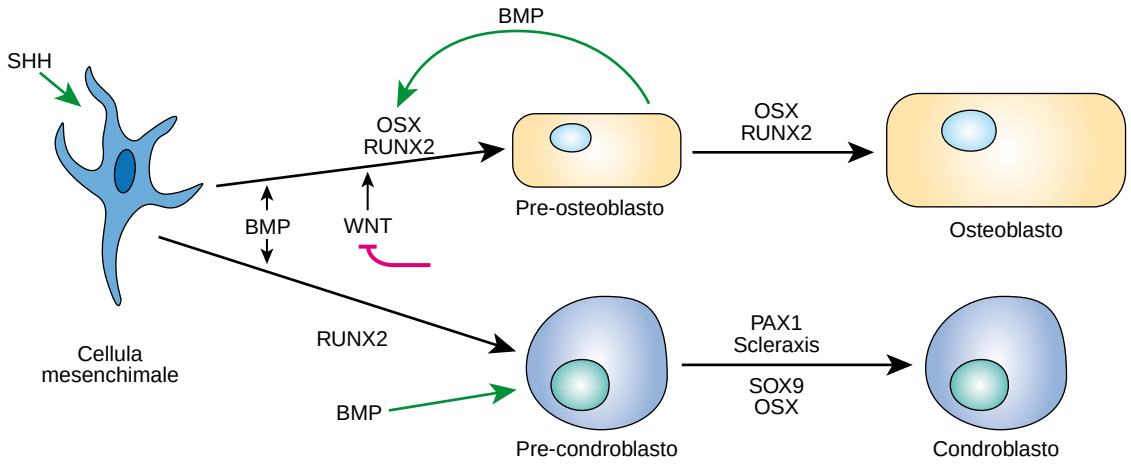



**FIGURA 18-20** ■ Origine degli osteoblasti e dei condroblasti. Sono indicate alcuni dei fattori di crescita e trascrizionali che regolano tali processi. RUNX2 = runt-related transcription factor 2; OSX = osterix; PAX1 = paired box 1; SHH = sonig hedgeog; BMP = bone morphogenic protein; WNT = wingless and int.

a diventare condroblasti o osteoblasti i BMP inducono l'espressione del fattore di trascrizione **RUNX2** (runt-related transcription factor 2). In modelli animali, se il gene *Runx2* viene eliminato, non si ha formazione di tessuti scheletrici. Anche l'espressione parziale o alterata del gene produce difetti scheletrici. In assenza di *Runx2*, tuttavia, *Runx1* può consentire il differenziamento dei precondroblasti. I bersagli molecolari di RUNX2 compren-

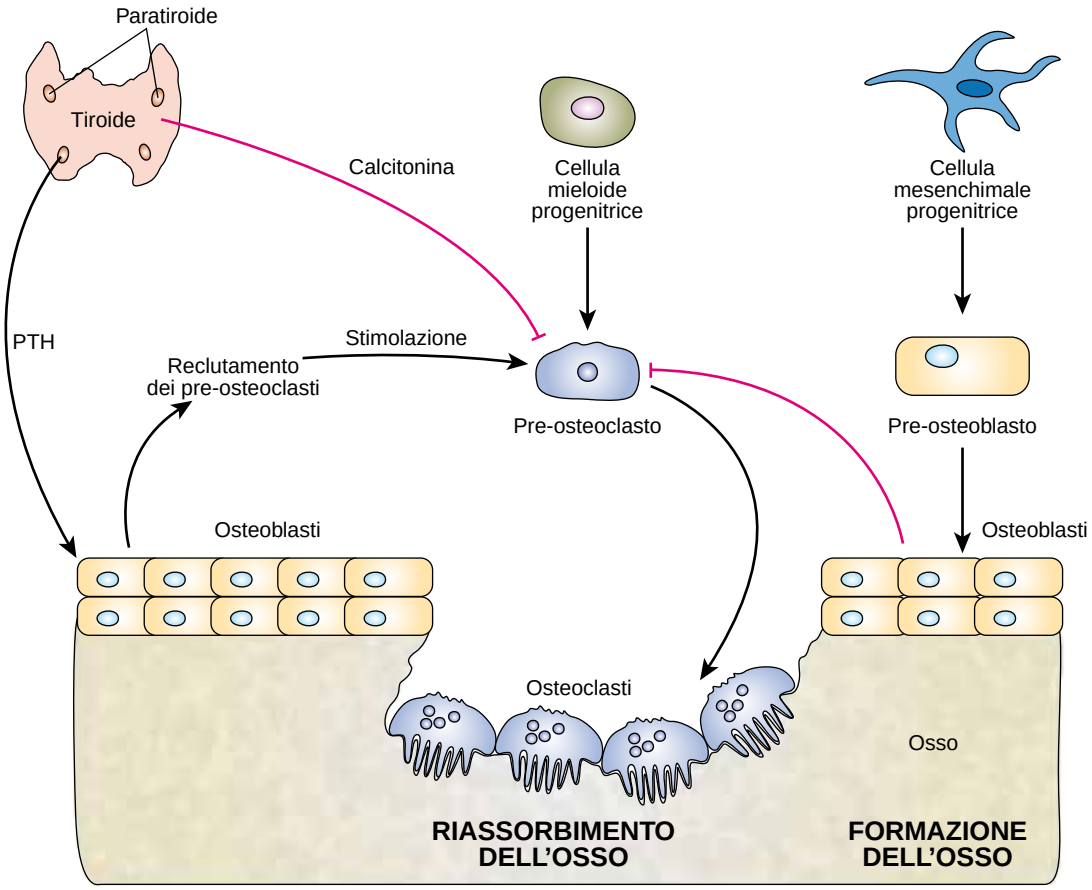



**FIGURA 18-21** ■ Rimodellamento dell'osso. L'osso viene continuamente riassorbito dagli osteoclasti e formato dagli osteoblasti con un processo accoppiato, mediato dal rilascio di fattori di crescita da parte dell'osso durante il riassorbimento e da molecole prodotte dagli osteoblasti, in risposta a segnali ormonali, che regolano l'attività degli osteoclasti. PTH = paratormone.

dono regolatori della proliferazione cellulare, componenti della matrice ossea, fattori angiogenetici e proteine di segnalazione del differenziamento. Successivamente la scelta tra differenziamento osteoblastico o condroblastico è determinata da membri di un'altra famiglia di fattori di crescita, quella di **WNT** (wingless and int) L'attivazione della via di segnalazione canonica di WNT, che passa attraverso la traslocazione della β-catenina nel nucleo (vedi Capitolo 2), induce il differenziamento in senso osteoblastico, mentre l'inibizione di tale via favorisce il differenziamento delle cellule mesenchimali in precondroblasti. In questi ultimi i BMP inducono l'espressione di geni che codificano fattori di trascrizione tipici della cartilagine quali **PAX1** (paired box 1), **SOX9** (SRY-sex-determining region Y-box 9) e **Scleraxis** (Fig. 18-19). Sia nei condroblasti che negli osteoblasti i BMP mantengono un elevata espressione di RUNX2 e di un gene chiave nella determinazione di cellule osteo-progenitrici che codifica per la proteina **Osterix** (OSX). Anche in questo caso, l' eliminazione in modelli animali del gene *osx* provoca assenza di osso.

### *Gli osteoclasti*

Man mano che l'osso si accresce, per deposizione di matrice da parte degli osteoblasti, l'osso neo-formato deve essere modellato nella forma e devono essere scavati i canali che consentono il passaggio di vasi e nervi (canali di Volkmann e di Havers). Tutto ciò richiede un'attività erosiva dell'osso, che viene svolta dagli osteoclasti. Gli osteoclasti sono cellule multinucleate che provengono dal flusso sanguigno. Derivano dal progenitore mieloide CFU-GEMM (vedi Capitolo 17) che dà origine ai monociti o dagli stessi monociti circolanti. Gli osteoclasti possono dissolvere sia la componente inorganica che quella organica dell'osso, consentendone quindi il rimodellamento. La loro attività è strettamente coordinata con l'attività degli osteoblasti. Difatti, mentre gli osteoblasti depongono matrice, gli osteoclasti la riassorbono (Fig. 18-21). Le cellule dello stroma del midollo osseo e gli stessi osteoblasti in risposta a diversi segnali tra cui quello dell'**ormone paratiroideo** (PTH) controllano il differenziamento delle CFU-GEMM e dei monociti circolanti in pre-osteoclasti. In primo luogo l'osteoclasto-

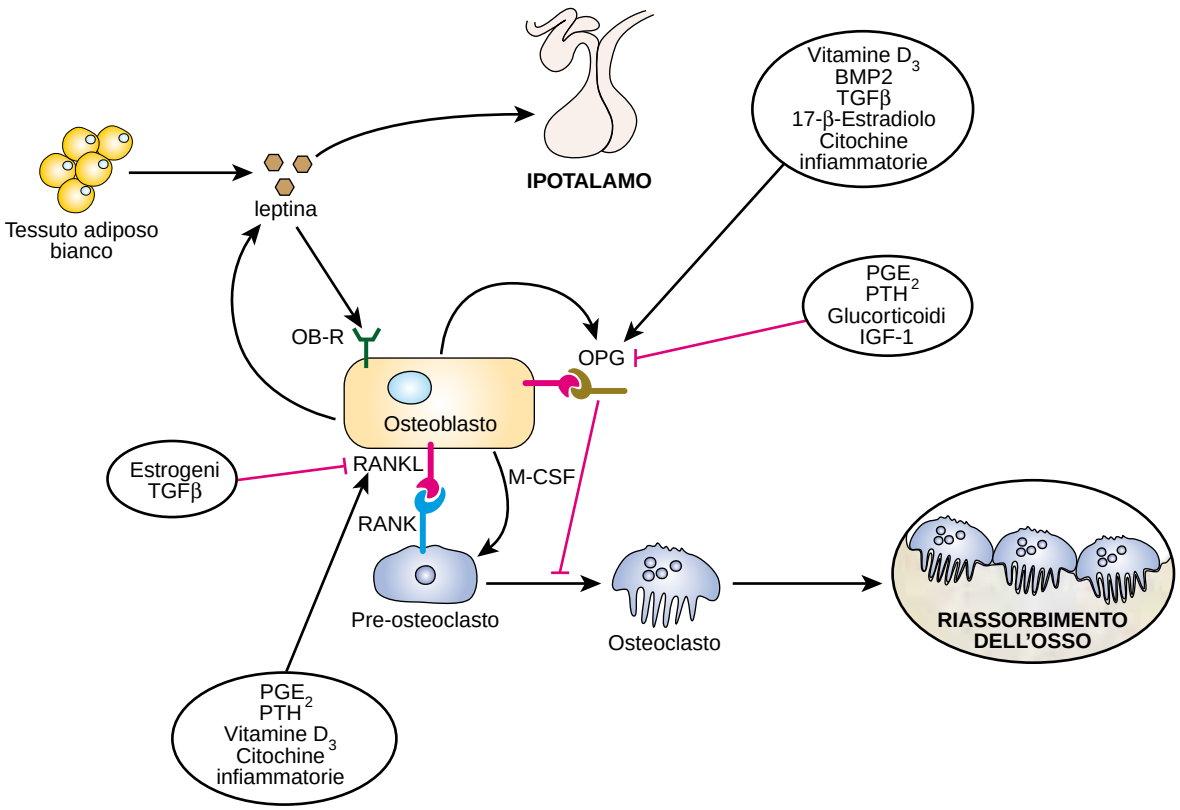



**Figura 18-22** ■ Regolazione del riassorbimento dell'osso. Gli osteoblasti sintetizzano due proteine, RANKL e OPG, che sono responsabili della comunicazione fra gli osteoblasti e i precursori degli osteoclasti. RANKL e OPG hanno effetti opposti: il primo induce riassorbimento, il secondo la inibisce. Diverse altre molecole possono modulare positivamente o negativamente l'attività degli osteoblasti, regolando, di conseguenza, la loro interazione con gli osteoclasti. La leptina, secreta dagli adipociti, può agire attraverso l'ipotalamo bloccando l'attività degli osteoblasti, o può invece agire direttamente sui recettori presenti negli osteoblasti, aumentandone la funzione. IGF-1 = insulin-like growth factor 1; M-CSF = macrophage-colony stimulating factor; OB-R = obese receptor, recettore per la leptina; OPG = osteoprotegerin; $PGE_2$ = prostaglandin $E_2$; PTH = parathyroid hormone; RANK = receptor activator of nuclear factor-kB; RANKL = ligando di RANK; TGFβ = transforming growth factor β. Le frecce indicano vie stimolatrici; linee barrate indicano vie inibitorie.

genesi (formazione degli osteoclasti) richiede il contatto diretto tra cellule stromali/osteoblasti e pre-osteclasti, attraverso l'interazione del recettore di superficie **RANK** (receptor activator of nuclear factor kappa B), espresso dai pre-osteoclasti e del suo controrecettore **RANKL** (ligando di RANK), presente sulla membrana delle cellule stromali e sugli osteoblasti. Le cellule stromali e gli osteoblasti producono inoltre diversi fattori solubili tra cui **M-CSF** (monocyte-colony stimulating factor), necessari alla migrazione, proliferazione e fusione dei pre-osteoclasti. Infine gli osteoblasti secernono un fattore solubile che inibisce l'interazione RANKL-RANK, la **Osteoprotegerina (OPG)** che antagonizza l'effetto di RANKL, inibendo la formazione e l'attività degli osteoclasti (Fig. 18-22).

### *Ossificazione diretta (intramembranosa) e ossificazione indiretta (o endocondrale)*

Nell'ossificazione diretta o intramembranosa, cellule mesenchimali proliferano e condensano in noduli compatti. Alcune di queste cellule formano i capillari, altre sono indotte dai BMP ad esprimere *Runx2* e differenziare in osteoblasti.

L'ossificazione **indiretta** o **endocondrale**, richiede la formazione di tessuto cartilagineo da cellule mesenchimali aggregate, e la successiva sostituzione della cartilagine con l'osso. L'ossificazione indiretta può essere divisa in almeno cinque fasi successive. Durante questo processo i condroblasti devono: 1) formarsi; 2) proliferare; 3) andare incontro a ipertrofia; 4) degenerare per apoptosi; 5) essere sostituiti dagli osteoblasti. I cambiamenti sequenziali nel comportamento dei condroblasti sono rigidamente controllati da fattori sistemici e paracrini che, legando recettori, attivano vie di segnalazioni intra-cellulari e fattori di trascrizione specifici (Fig. 18-23). Abbiamo già visto nel Capitolo 11 e nei paragrafi precedenti, come avviene la formazione dello sclerotomo e dei condroblasti. Nella fase successiva, le cellule condro-progenitrici (pre-condroblasti) determinate, condensano per formare dei noduli compatti e differenziano in condroblasti, che cominciano a deporre matrice cartilaginea. La **condensazione** e la stabilità dei noduli compatti richiede cambiamenti dell'adesione cellulare e dell'architettura del citoscheletro, eventi regolati da interazioni cellula-cellula e cellula-matrice. Alcune delle molecole coinvolte sono le proteine di superficie **N-caderina** e **N-CAM** (neural cell adhesion molecule) e molecole extracellulari come la **Fibronectina**, le **tenascine** e i **sindecani**. Nonostante la condrogenesi sia regolata da segnali combinati di un gran numero di fattori, si ritiene che la condensazione rappresenti l'evento cruciale per la determinazione condrogenica, a cui fa seguito l'accumulo di fattori di trascrizione specifici e di proteine strutturali. Abbiamo già visto come SOX9, un fattore di trascrizione la cui espressione è direttamente indotta da membri della famiglia del BMP, sia uno dei fattori specifici espressi dai pre-condroblasti; questo fattore rimane espresso anche nei condroblasti in proliferazione. L'alterata espressione del gene *Sox9* in modelli animali, come anche nell'uomo, provoca severi difetti degli abbozzi cartilaginei.

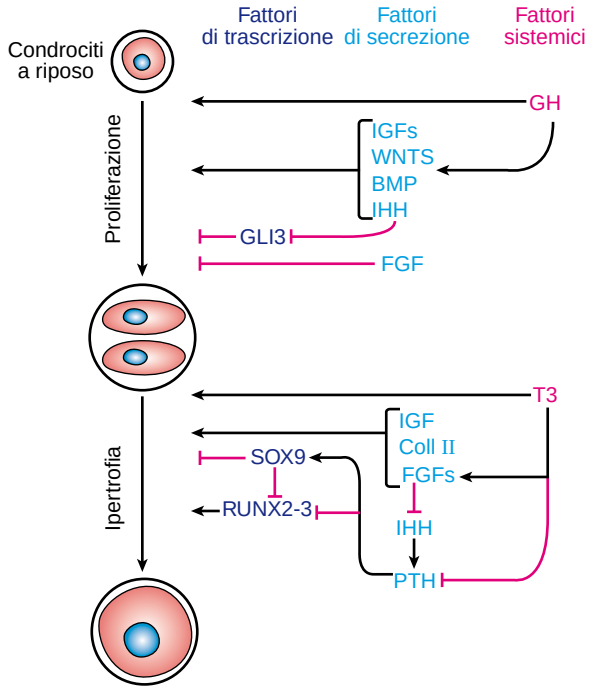



**Figura 18-23** ■ Schema di alcune delle molecole coinvolte nella regolazione della proliferazione e ipertrofia dei condrociti durante l'ossificazione endocondrale. Le frecce indicano le vie stimolatorie, mentre le linee barrate quelle inibitorie. Coll II = collagene di tipo II.

Man mano che i condroblasti proliferano e depongono matrice cartilaginea, rimangono inclusi nelle lacune cartilaginee, diventando **condrociti**, e formano così l'abbozzo scheletrico. Durante la condrogenesi e l'ossificazione endocondrale, la proliferazione dei condroblasti è regolata da vari fattori sistemici, come l'**ormone paratiroideo** (**PTH**) e l'**ormone della crescita** (**GH**) o paracrini, come membri della famiglia dell'**FGF** (fibroblast growth factor), dell'**IGF** (insulin growth factor), di **WNT**, di **IHH** (indian hedgehog) e da **BMP**, come anche da interazioni cellula-cellula e cellula-matrice. Nella fase successiva, i condrociti smettono di dividersi e aumentano considerevolmente di volume diventando ipertrofici. SOX9 è espresso dai condroblasti proliferanti, ma non dai condrociti ipertrofici, che invece esprimono, già nelle fasi molto iniziali dell'ipertrofia, **RUNX2** che, insieme a **RUNX3** e al fattore di trascrizione **MEF2C** (myocyte-specific enhancer factor 2C) ne promuove l'ipertrofia. Anche in questi eventi la combinazione di segnali sistemici, paracrini e di interazione cellula-cellula e cellula-matrice svolge un ruolo fondamentale. L'aumento di volume dei condrociti richiede inoltre la degradazione della matrice extracellulare adiacente, operata da enzimi della famiglia delle metallo-proteasi, **MMP** (matrix metalloproteases) e **ADAM** (a disintegrin and metalloproteases), secreti dai condrociti ipertrofici. La degradazione della matrice ad opera di questi enzimi è anche un pre-requisito per l'invasione della cartilagine ipertrofica da parte di vasi sanguigni, osteoclasti e osteoblasti. I condrociti ipertro-

fici cominciano a secernere l'enzima **fosfatasi alcalica** che probabilmente innesca i processi di calcificazione della matrice. Di conseguenza i condrociti non possono più nutrirsi per diffusione e vanno incontro a degenerazione. I condrociti muoiono probabilmente per apoptosi, anche se questo aspetto, insieme ai meccanismi della calcificazione della matrice non sono ancora stati del tutto chiariti.

L'invasione vascolare è favorita dal **VEGF** (vascular endothelial growth factor), prodotto dai condrociti ipertrofici in risposta a fattori paracrini, come membri della famiglia degli FGF, e regolato da RUNX2. Il VEGF oltre a promuovere l'angiogenesi, regolerebbe l'attività di riassorbimento degli osteoclasti e la loro sopravvivenza. Infatti gli osteoclasti devono a questo punto riassorbire la matrice cartilaginea calcificata per consentire agli osteoblasti di deporre matrice ossea.

### *La formazione degli arti*

L'arto dei vertebrati è un organo estremamente complesso, con un arrangiamento asimmetrico delle sue parti, risultato della combinazione coordinata di processi multipli, che comprendono la crescita, la stabilizzazione di uno schema e la "morte cellulare programmata" (PCD, programmed cell death). Il vantaggio di non essere un organo indispensabile per la sopravvivenza, ha consentito studi genetici e di manipolazione che hanno portato alla comprensione di molte delle vie molecolari responsabili della formazione dell'arto.

Come abbiamo visto la prima indicazione morfologica di sviluppo dell'arto è l'insorgenza di un ispessimento pari e simmetrico in regioni laterali ben definite lungo l'asse antero-posteriore dell'embrione. Tale ispessimento è dovuto all'accumulo di cellule del mesoderma somatico (somatopleura) al di sotto dell'ectoderma che differenziano in cellule mesenchimali (Fig. 18-24). Metodi di embriologia sperimentale hanno dimostrato che l'attività combinatoria di specifici **geni *Hox*** espressi nel mesoderma parassiale/intermedio determina la posizione in cui l'arto deve sorgere. L'espressione dei geni *Hox* è a sua volta regolata dall'**acido retinoico** (RA); infatti, l'inibizione della sintesi

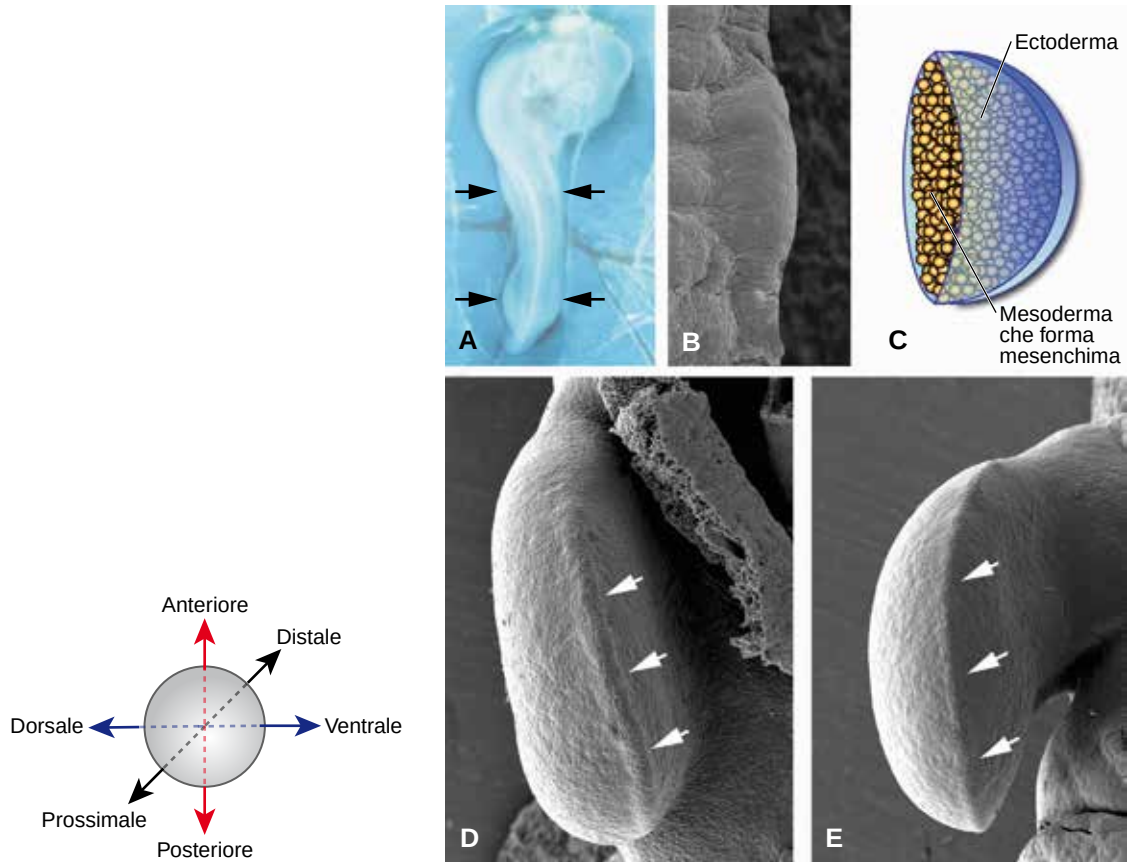



**Figura 18-24** ■ Visione dello sviluppo dell'arto. *A)* Vista di un embrione di pollo allo stadio 17HH. Notare la presenza dei quattro abbozzi degli arti. *B)* Microfotografia al miscroscopio elettronico a scansione che mostra una visione dorsale dell'iniziale ispessimento dell'abbozzo dell'ala in un embrione di pollo allo stadio 16HH. *C)* Schema raffigurante l'iniziale abbozzo dell'arto: sono indicate le due principali componenti (l'ectoderma è mostrato in blu e le cellule mesodermiche in giallo). *D)* Vista distale di un abbozzo allo stadio 23HH. *E)* Vista distale di un abbozzo allo stadio 26HH. Notare la prominenza della CEA, indicata dalle frecce, più marcata allo stadio 23HH che a quello 26HH. In tutti i pannelli il polo anteriore è in alto. (*Da* M. Fernandez-Teran, M.A. Ros, The apical ectodermal ridge: morphological aspects and signaling pathways, Int. J. Dev. Biol. 52, 857-871, 2008, doi:10.1387/ijdb.072416mf, published on line: 11th August 2008, per gentile concessione di UBC Press e degli autori, modificata.)

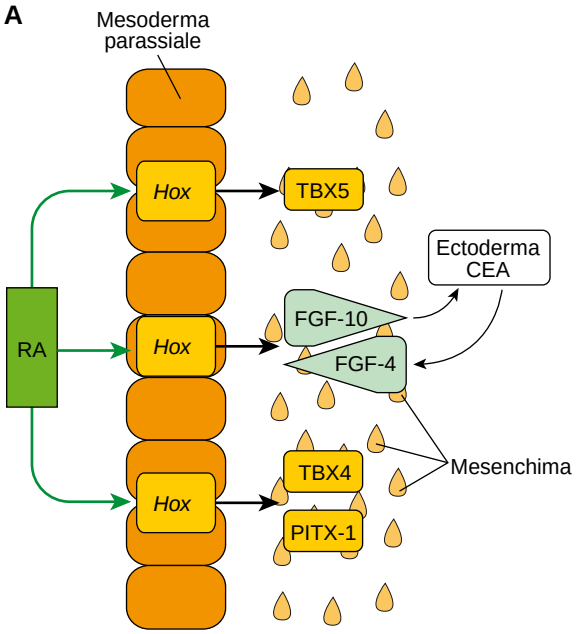
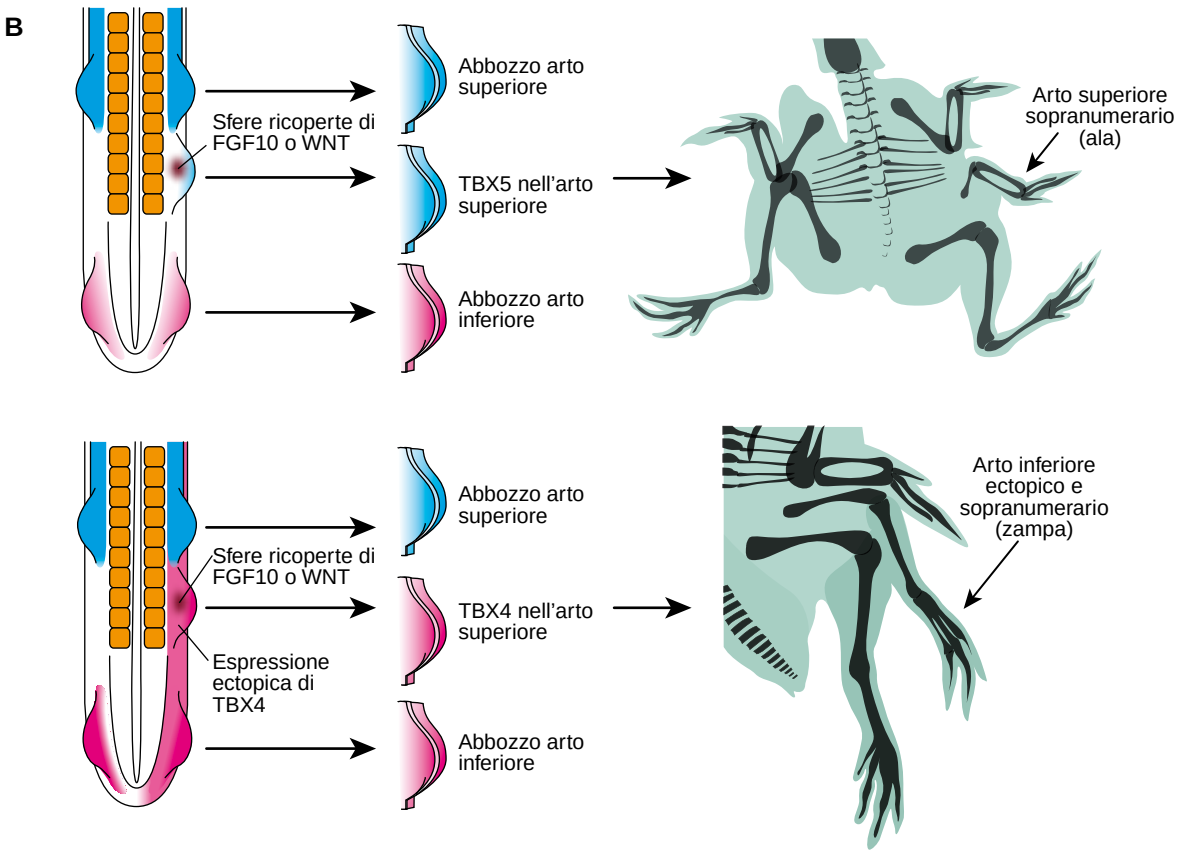



**Figura 18-25** ■ *A)* Segnalazioni molecolari coinvolte nello sviluppo iniziale degli arti. *B)* Esperimenti nell'embrione del pollo che mostrano la formazione di un'ala sopranumeraria (arto superiore) indotta dal trapianto al di sotto dell'epidermide della regione anteriore di sfere che rilasciano FGF-10 e dalla corretta espressione di TBX5; l'espressione di TBX4 nella stessa regione causa invece lo sviluppo di una zampa (arto inferiore) invece di un'ala.



di RA previene la formazione degli abbozzi degli arti. A seguito di questi processi nel mesoderma laterale somatico delle corrispondenti regioni vengono espressi **fattori di trascrizione T box** (TBX): **TBX5** nell'area degli abbozzi degli arti superiori e **TBX4** nella regione degli arti inferiori. In questa regione recentemente è stata evidenziata l'espressione di un altro fattore di trascrizione chiamato **PITX-1** (paired-like homeodomain 1) che sembra svolgere un ruolo anche più importante di TBX4. Questi fattori stimolano l'espressione principalmente di **FGF-10**, ma anche di altri FGF e BMP, da parte dello stesso mesoderma. A sua volta FGF-10 stimola l'ectoderma soprastante, che diventa la **cresta ectodermica apicale (CEA)**, a produrre **FGF-4/8**; iniziano così una serie di reciproche stimolazioni che continueranno durante lo sviluppo degli arti (Figg. 18-25, 18-26, 18-28). Una volta iniziate queste interazioni, l'abbozzo contiene informazioni sufficienti per il successivo sviluppo anche se isolato dal corpo dell'embrione.

Il successivo sviluppo dell'arto dipende da interazioni cellulari guidate da **tre centri di segnalazione** che si stabiliscono mentre l'abbozzo si forma: la cresta ectodermica apicale (CEA); la **zona di attività polarizzante** (**ZPA**), un gruppo di cellule mesenchimali che si addensano nella regione posteriore dell'abbozzo, e l'**ectoderma dorsale** e **ventrale al di fuori della CEA**. Questi centri di segnalazione dirigono lo sviluppo dell'arto nei tre assi cartesiani: l'asse **prossimale-distale** (dalla spalla o dall'anca alla punta delle dita della mano o del piede), diretto dall'attività della CEA che determina la posizione di ogni osso e muscolo in una precisa sequenza; l'asse **antero-posteriore**, parallelo a quello del corpo, stabilito dall'attività della ZPA, che determina, ad esempio, la posizione delle dita nella mano (il pollice o l'alluce sono le dita più anteriori, il mignolo e il piccolo dito, quelle più posteriori) e l'asse **dorso-ventrale**, guidato dall'ectoderma dorsale e ventrale al di fuori della CEA, che determina, ad esempio, la posizione del palmo rispetto al dorso della mano (Fig. 18-26). La presenza di questi centri di segnalazione, inizialmente dimostrata soprattutto negli uccelli, è stata confermata nei mammiferi, uomo compreso. Nonostante tratteremo i centri di segnalazione separatamente, è necessario tener presente che la loro funzione è interdipendente e che l'adeguata interazione tra di loro è essenziale per il corretto sviluppo morfologico dell'arto.

Le cellule mesenchimali che inizialmente si addensano nell'abbozzo sono destinate a dare origine principalmente a tessuto cartilagineo e connettivo. Difatti con l'eccezione della clavicola, che è in parte un osso membranoso, le rimanenti ossa degli arti sono di origine endocondrale. I centri di ossificazioni primari compaiono tra la 7ª e la 12ª settimana; l'ossificazione comincia nella clavicola e quindi, a seguire, nel femore, nell'omero, nel radio, nell'ulna e nella tibia. Le ossa del pube ossificano verso la fine della 20ª settimana, mentre alcuni ossicini carpali e tarsali ossificano dopo la nascita.

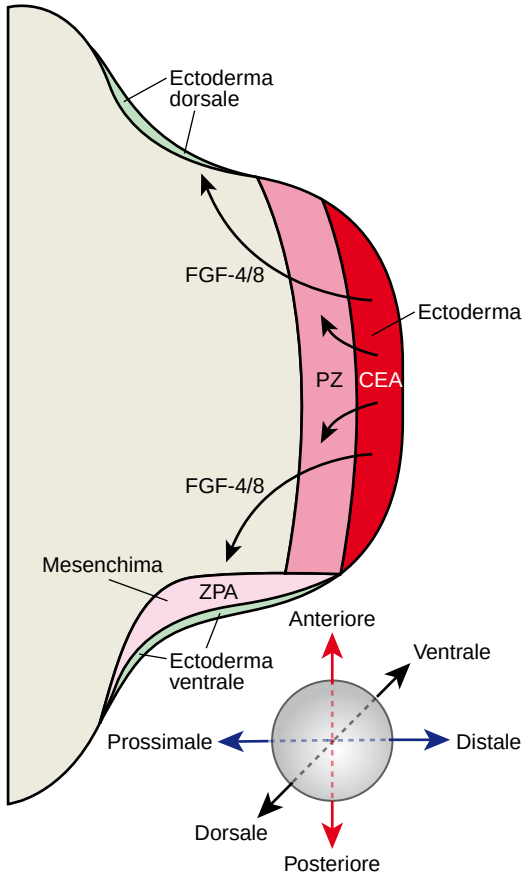



**Figura 18-26** ■ Rappresentazione schematica dei centri di segnalazione nell'abbozzo dell'arto. CEA = cresta ectodermica apicale; ZPA = zona di attività polarizzante; PZ = zona di progressione.

### *La cresta ectodermica apicale (CEA)*

Come sopra già descritto, mentre le cellule mesenchimali proliferano e si accumulano nella regione dell'arto producendo FGF-10 e BMP, inducono le cellule del sovrastante ectoderma a formare un ispessimento nella regione distale dell'abbozzo, la CEA (Figg. 18-24, 18-25 e 18-26). La CEA rappresenta il maggiore centro di segnalazione durante lo sviluppo dell'arto. La sua attività è dovuta principalmente alla secrezione di FGF-4/8 e regola molteplici eventi: mantiene le cellule mesenchimali sottostanti in una condizione plastica che consente la **crescita prossimo-distale** prevenendone il differenziamento, mantiene l'espressione di molecole che regolano l'asse antero-posteriore prodotte dalle ZPA (SHH, RA) e interagisce con molecole che regolano l'asse dorso-ventrale prodotte dall'ectoderma dorsale e ventrale al di fuori della CEA. La regione subito al di sotto della CEA è chiamata la **zona di progressione** (**PZ**), ossia la zona di elevata proliferazione delle cellule mesenchimali che si estende per circa 200-300 µm. Si ritiene che gli FGF prodotti dalla CEA siano distribuiti secondo un gradiente lungo l'asse prossimo-distale, mantenendo la prolifera-

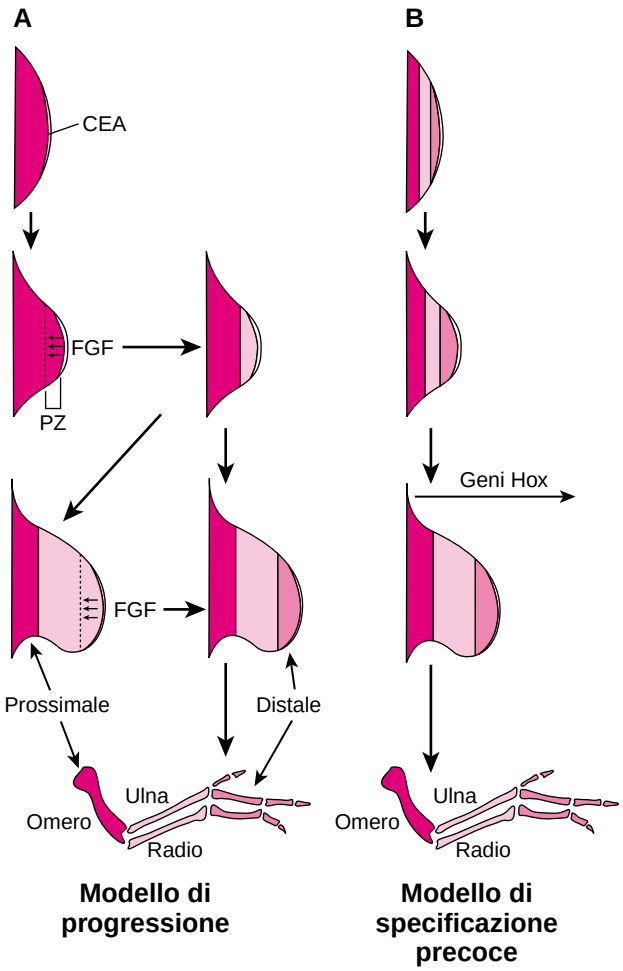



**Figura 18-27** ■ Due modelli per la specificazione delle strutture lungo l'asse prossimo-distale dell'arto. *A)* Modello della zona di progressione. Secondo questo modello, inizialmente, tutte le cellule mesenchimali dell'abbozzo avrebbero un'identità "prossimale". Tuttavia, le cellule al di sotto della CEA, quelle nella zona di progressione (PZ), sottoposte all'azione degli FGF prodotti dalla CEA, vengono ri-specificate ad un destino via via più distale. Queste cellule "conterebbero" il numero di cicli di proliferazione: quelle che lasciano la zona di progressione sono andate incontro ad un numero di cicli inferiore e differenziano in strutture prossimali, mentre quelle che risiedono nella zona di progressione per più tempo, andando incontro ad un numero di cicli superiore, differenziano in strutture distali. *B)* Modello della specificazione precoce. Secondo questo modello, tutte le strutture sono specificate precocemente durante lo sviluppo dell'arto. Le popolazioni dei progenitori dei diversi segmenti si espandono man mano che l'abbozzo si accresce. La specificazione sarebbe probabilmente determinata dal "codice Hox" espresso lungo l'asse prossimo-distale dell'arto.

zione delle cellule mesenchimali sottostanti. Il meccanismo mediante il quale PZ determina la posizione delle strutture dell'arto lungo l'asse prossimo-distale è poco conosciuto. Una delle ipotesi più accreditata (modello della zona di progressione) è che le cellule mesenchimali che rimangono più a lungo proliferanti in questa area, diano origine a strutture distali (per esempio le falangi), mentre quelle che escono subito dall'area diano origine alle strutture più prossimali (per esempio l'omero) (Fig. 18-27).

### *La zona di attività polarizzante (ZPA)*

La ZPA è formata da un gruppo di cellule mesenchimali, che sono specificate molto precocemente probabilmente dal RA, localizzate nel confine posteriore dell'abbozzo dell'arto. Queste cellule forniscono le informazioni necessarie per istruire le cellule mesenchimali sulla loro posizione lungo l'asse antero-posteriore. Quando cellule della ZPA di un embrione di pollo giovane vengono trapiantate nella regione anteriore di un altro abbozzo dell'arto, si raddoppia il numero delle dita e le strutture delle dita sopranumerarie sono l'immagine speculare delle strutture normalmente prodotte. L'attività della ZPA dipende dalla produzione di SHH e probabilmente di RA.

### *L'ectoderma dorsale e ventrale*

La CEA segna il confine tra l'ectoderma dell'abbozzo dell'arto in una regione dorsale e una ventrale. I margini della CEA sono stabiliti dall'espressione dell'enzima

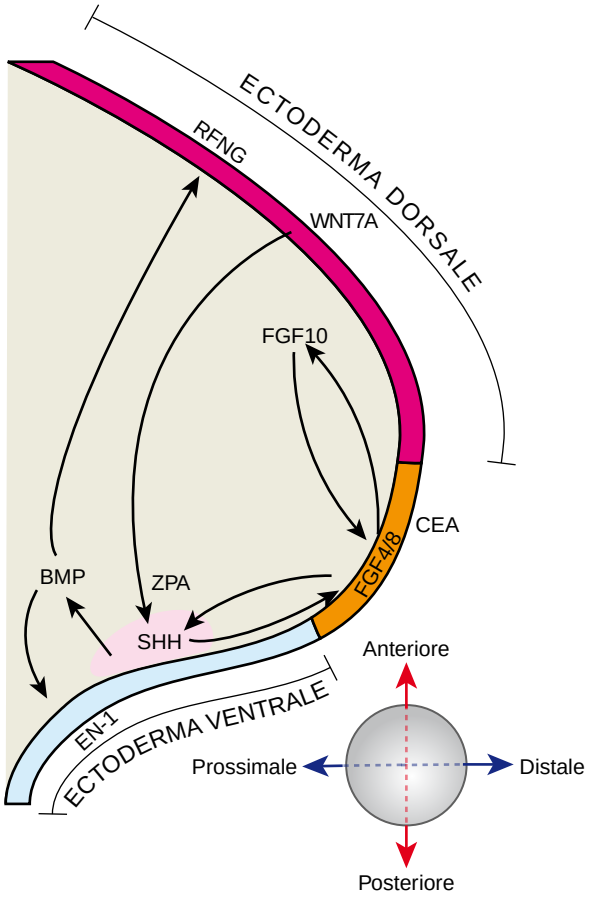



**Figura 18-28** ■ Principali cascate regolative nell'induzione e nel mantenimento dei centri di segnalazione.

**RFNG** (radical fringe), una glicosiltransferasi. Durante la formazione dell'abbozzo dell'arto, RFNG è espresso nella metà dorsale dell'ectoderma dell'arto. **EN-1** (engrailed-1), invece è un fattore di trascrizione espresso dalle cellule dell'ectoderma ventrale, che inibisce l'espressione di RFNG. Esperimenti nel topo indicano che i BMP hanno un ruolo rilevante nell'indurre questa regionalizzazione che regola quindi lo sviluppo del mesenchima rispettivamente nelle strutture dorsali e ventrali dell'arto, e che l'ectoderma dorsale produce **WNT-7a**, attivatore del gene ***Lmx1*** (LIM normobox transcription factor 1) nelle cellule mesenchimali dorsali, che ne specifica il destino; l'ectoderma ventrale, invece, specificherebbe le strutture ventrali via EN-1 (Fig. 18-28).

### I GENI *Hox* NELLO SVILUPPO DELL'ARTO

Mentre inizialmente si riteneva che i prodotti dei geni *Hox* regolassero esclusivamente la posizione degli arti, studi di alterazione di funzione e di manipolazione genica sul pollo e sul topo hanno dimostrato che, in realtà, sono essenziali anche per il corretto sviluppo dell'arto lungo gli assi cartesiani regolando l'attività sia della CEA che della ZPA. A differenza di quanto avviene durante la formazione del tronco, mutazioni di questi geni nell'arto non portano alle classiche trasformazioni "omeotiche", ma prevalentemente a perdita e/o riduzione di elementi scheletrici. È stato dimostrato che i geni *Hoxa* e *Hoxd* controllano l'espressione di SHH nelle cellule della ZPA. In realtà, però, in assenza di ambedue i gruppi *Hoxa* e *Hoxd*, lo sviluppo dell'arto anteriore è arrestato prima di quando la funzione di SHH è abrogata. In ambedue i casi l'effetto è mediato da una insufficiente attività della CEA, suggerendo che il controllo dell'attività della CEA da parte dei geni *Hox* precede l'induzione dell'espressione di SHH nelle ZPA. In ogni caso l'espressione di ciascuno dei geni dei cluster *Hoxa* e *Hoxd* può essere associata a specifici segmenti scheletrici degli arti. Per esempio *Hoxd9* è espresso nella scapola, *Hoxd9* e *Hoxd10* nell'omero e così via.

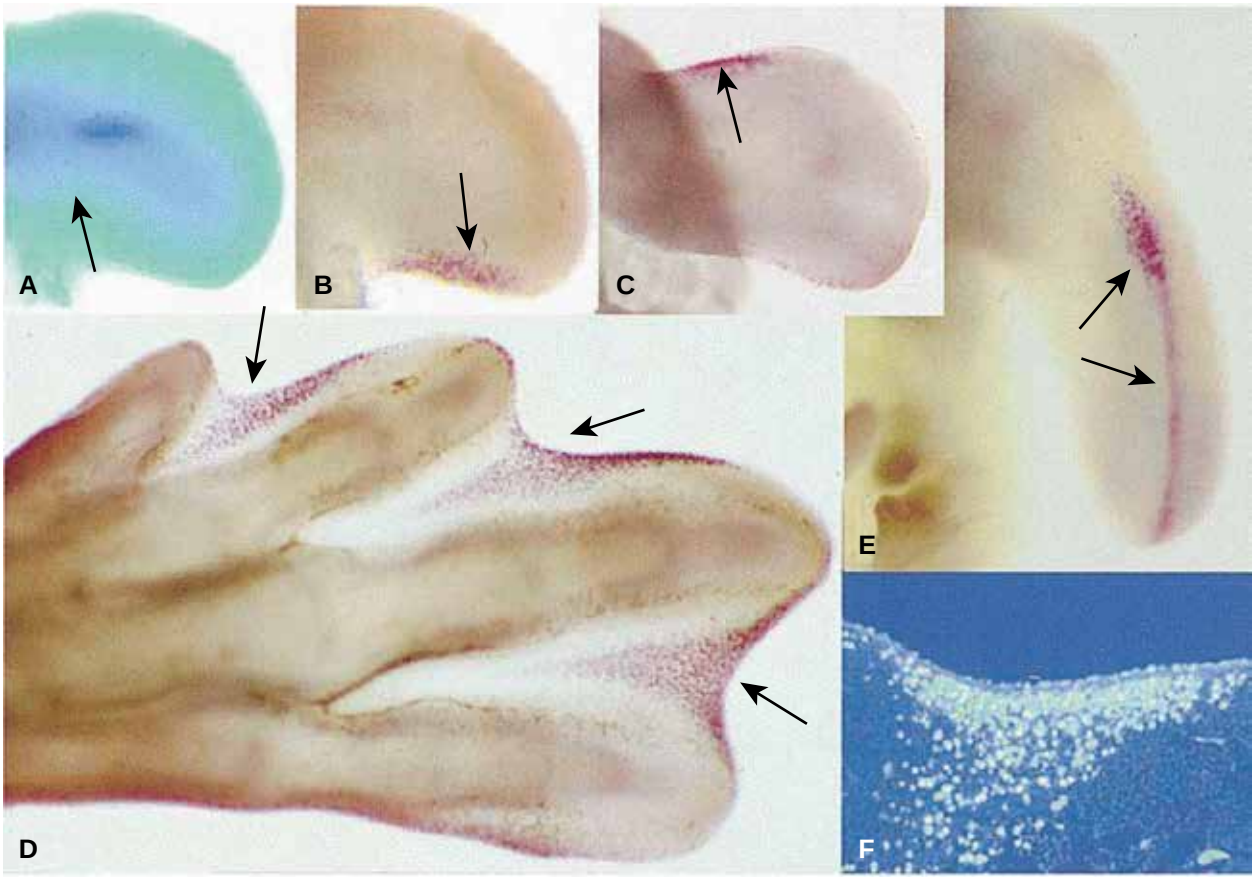



**FIGURA 18-29** ■ Aree di morte cellulare programmata (PCD) nell'arto dell'embrione di pollo in sviluppo. Abbozzo dell'arto anteriore di embrione di pollo che mostra un'area di PCD nelle cellule mesodermiche centrali *(A)*, nella regione posteriore *(B)*, in quella anteriore *(C)*, in quella interdigitale *(D,F)* e nella CEA *(E)*, a diversi stadi dello sviluppo. Le aree di PCD sono evidenziate con coloranti vitali (colore viola). *F)* Sezione longitudinale del secondo spazio interdigitale allo stesso stadio mostrato in (*D)*, evidenziato con saggio TUNEL (terminal uridine deoxynucleotid transferase dUTP nick end labelling), un comune metodo di colorazione istochimica che rileva frammentazione del DNA da morte cellulare programmata. (*Da* V. Zuzarte-Luís, J.M. Hurlé, Programmed cell death in the developing limb, Int. J. Dev. Biol. 46, 871-876, 2002, per gentile concessione di UBC Press e degli autori, modificata.)

Alcuni bersagli molecolari di geni *Hox* sono stati identificati e comprendono anche geni coinvolti nell' ossificazione endocondrale, quali *Bmp2* e *4*, *Shox2* (short stature homeobox 2, l'omologo murino del gene umano della statura bassa) e *Sox9*.

### La morte cellulare programmata nello sviluppo dell'arto

Oltre agli eventi descritti di proliferazione e differenziamento, un evento assolutamente necessario per la definizione della forma e della grandezza dell'arto è rappresentato dalla morte cellulare. La morte di una particolare cellula durante lo sviluppo dell'arto avviene per "morte cellulare programmata" (PCD), ovvero a seguito di eventi geneticamente determinati nello spazio e nel tempo. Questa è essenziale, ad esempio per la formazione delle dita o delle articolazioni. Infatti, PCD è stata osservata nelle regioni interdigitali, nella regione che separa l'ulna dal radio e anche nelle regioni anteriore e posteriore della porzione distale dell'arto, probabilmente per determinare la forma finale dell'arto (Fig. 18-29).

## La migrazione dei precursori muscolari

Come abbiamo visto, le cellule del mesoderma laterale, differenziandosi in mesenchima nelle specifiche regioni, iniziano la formazione dell'arto e daranno origine alle strutture scheletriche corrispondenti. Le cellule dell'abbozzo dell'arto diventano però ben presto eterogenee, per la colonizzazione da parte dei precursori endoteliali dei vasi sanguigni e muscolari provenienti dal somite. I precursori miogenici destinati a differenziare in muscoli ipoassiali, compresi quelli dell'arto, originano a livello della porzione dorso-laterale del somite (dermamiotomo), dove sono determinati dalla combinazione di segnali provenienti dai tessuti adiacenti. Le cellule destinate a formare muscolo a livello degli arti devono, dopo la determinazione in senso miogenico, delaminare, andando incontro a una transizione epitelio-mesenchima, essere transitoriamente inibite a differenziare in mioblasti (per poterlo fare solo nella regione di destinazione), diventare "competenti" a rispondere a segnali di reclutamento, seguire "percorsi" definiti di migrazione e aumentare di numero per consentire la formazione di una massa muscolare adeguata. Studi su mutanti animali spontanei e sperimentali hanno cominciato a chiarire i meccanismi alla base di questi eventi (Fig. 18-30). A livello della regione dorso-laterale del dermamiotomo le cellule che delaminano per raggiungere l'arto sono riconoscibili per l'espressione di **PAX3**. PAX3, inoltre, previene il differenziamento miogenico e induce l'espressione del recettore per l'HGF (hepatocyte growth factor), **c-MET** (mesenchymal-epithelial transition factor). L'HGF è prodotto dalle cellule mesenchimali dell'abbozzo dell'arto e attrae le cellule "competenti" (che esprimono c-MET). Nella definizione dei "percorsi" di migrazione e della localizzazione (dorsale o ventrale) delle cellule una volta raggiunto l'abbozzo, sembra essere coinvolto il sistema delle **Efrine** e dei loro recettori. È stato infatti dimostrato, nel topo, che i precursori migranti esprimono il **recettore EphA4**, mentre, le cellule mesenchimali presenti nelle regioni dove i precursori non devono passare, esprimono Efrina A5. Efrina A5 respinge le cellule che esprimono il recettore EphA4 e quindi restringerebbe la migrazione dei precursori muscolari EphA4-positivi ai loro territori nell'abbozzo dell'arto, non permettendone l'entrata in regioni embrionali non appropriate. Una volta raggiunte le regioni dell'abbozzo dell'arto, i precursori dei mioblasti possono proliferare grazie

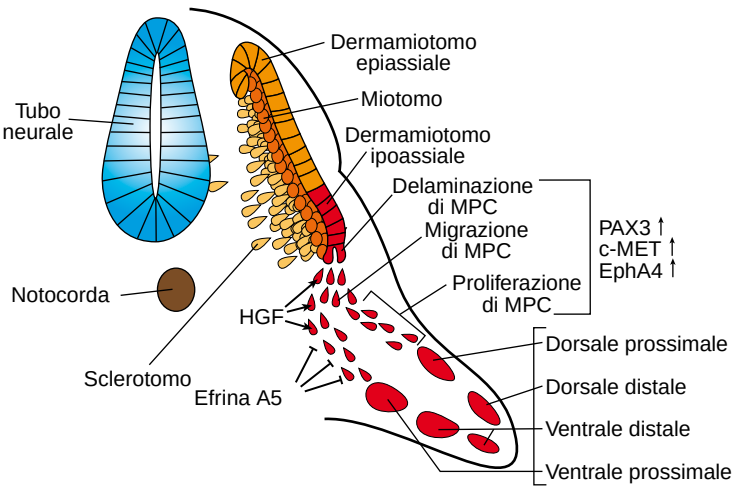



**Figura 18-30** ■ Formazione delle componenti muscolari dell'arto. Delaminazione e migrazione dei precursori miogenici dal somite. Cellule PAX3 positive delaminano dalla porzione dorso-laterale del dermamiotomo, e migrano verso l'abbozzo dell'arto in risposta al segnale dell'HGF, per il quale esprimono il recettore c-MET. Durante la migrazione i precursori seguono "percorsi" definiti dall'espressione di Efrina A5 espressa dalle cellule mesenchimali dell'abbozzo, per la quale esprimono il recettore EphA4. Una volta raggiunte le sedi definitive differenziano nei gruppi muscolari indicati. MPC = precursori miogenici. Le frecce indicano stimolazione, le linee barrate inibizione.

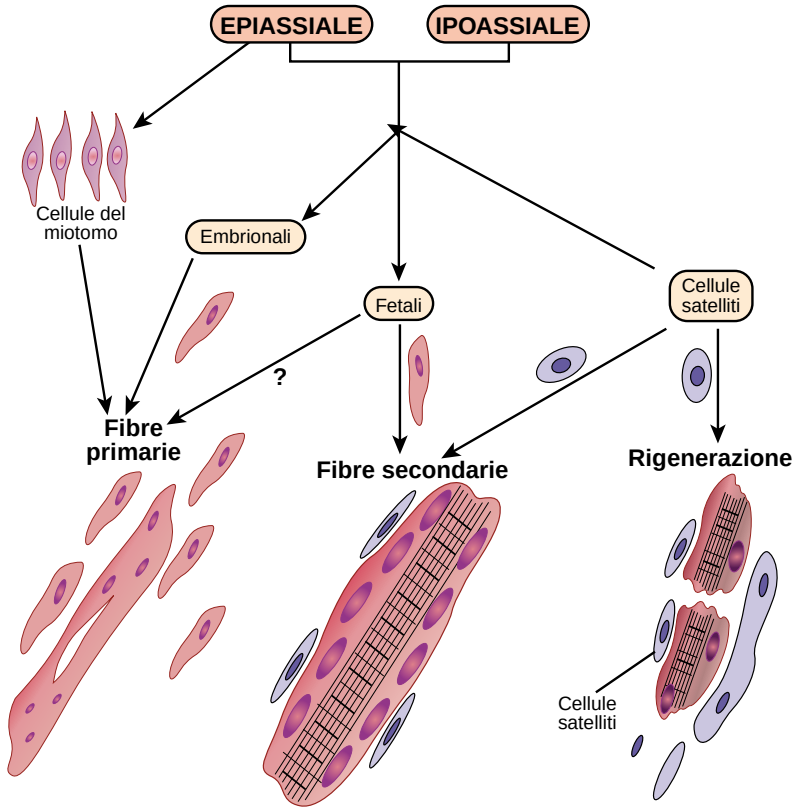



**Figura 18-31** ■ Modello delle popolazioni miogeniche nei vertebrati superiori. I precursori miogenici del dominio epiassiale del somite differenziano in cellule del miotomo da cui originano fibre primarie. Altri precursori dal somite (sia epiassiale che ipoassiale), i mioblasti embrionali, differenziano dando origine a fibre primarie, mentre altri precursori continuano a proliferare; questi, i mioblasti fetali, differenzieranno dando origine alle fibre secondarie. In questo stesso periodo, emerge la popolazione delle cellule satelliti.

all'azione dei membri della famiglia dell'FGF. Il differenziamento inizia nella regione prossimale dell'arto, probabilmente per la ridotta concentrazione di FGF. La popolazione di cellule miogeniche è però eterogenea e il differenziamento avviene a ondate successive, ad opera di diverse popolazioni (Fig. 18-31): i mioblasti cosiddetti "embrionali", che differenziano per primi formando le fibre "primarie" piccole e con pochi nuclei e che forniscono "l'impalcatura" su cui successivamente i mioblasti "fetali" differenziano fondendo fra di loro e con le fibre "primarie" per formare le fibre "secondarie". In questo stesso periodo emerge una terza popolazione, quella delle **cellule satelliti**, che non differenziano, esprimono PAX7 e/o PAX3, entrano in uno stato di quiescenza e si localizzano fra la lamina basale e la membrana plasmatica delle fibre muscolari neo-formate. Le cellule satelliti costituiscono una popolazione di cellule staminali del muscolo che garantisce la crescita post-natale e la riparazione in seguito a danno.

### *Vascolarizzazione e innervazione degli arti*

I condrociti ipertrofici producono **VEGF** (vascular endothelial growth factor), promuovendo la vascolarizzazione. La vascolarizzazione avviene per angiogenesi da rami brachiali dell'aorta. Presto uno di questi, futura arteria succlavia, si accresce maggiormente e si divide in una rete capillare che prende la forma a paletta dell'arto, formando un seno marginale che confluisce in alcuni canali venosi, uno dei quali diverrà poi la vena succlavia. Man mano che l'arto si accresce, le cellule endoteliali, che rispondono anche agli FGF, proliferano formando nuovi vasi secondo il disegno complesso caratteristico della specie.

Al contrario dei vasi, i nervi penetrano nell'arto dopo la formazione dei primordi muscolari. Infatti, la genesi delle fibre muscolari primarie e secondarie sembra essere indipendente dall'innervazione, ma non la loro ulteriore maturazione. L'innervazione dell'abbozzo è garantita dagli assoni dei neuroni siti nel midollo spinale, che raggiungono le destinazioni finali in base ai segnali già descritti nel Capitolo 12. Gli assoni sensoriali usano gli assoni motori come guida.

## ASPETTI CLINICI

Difetti scheletrici cranio-facciali sono stati già descritti nel Capitolo 14. In questo capitolo tratteremo alcuni dei difetti scheletrici generali e degli arti.

### *Difetti scheletrici*

#### *Difetti generali dello scheletro*

Difetti generali dello scheletro sono principalmente causati da alterazioni dei processi di condro- e/o osteo-genesi, e portano a ridotta o aumentata crescita dell'osso. Spesso tali difetti comportano anche difetti di altri orga-

**TABELLA 2**
Patologie dello sviluppo dell'apparato locomotore

| |
|---|
| ■ Difetti generali dello scheletro |
| Acondroplasia |
| Displasia tanatofora |
| Ipocondroplasia |
| Iperpituitarismo |
| ■ Difetti vertebrali |
| Microsomia emifacciale |
| Syndrome di Alagille |
| Disostosi spondilo-toracica |
| – di Jarcho-Levin |
| – spondilo-costale |
| Sindrome di Klippel-Feil |
| Spina bifida |
| ■ Difetti dello sviluppo degli arti |
| Meromelia |
| Amelia |
| Micromelia |
| Focomelia |
| ■ Difetti dello sviluppo delle dita |
| Brachidattilia |
| Polidattilia |
| Sindattilia |
| Mano fessa o piede fesso |
| Sindrome mano-piede genitale |

Nella tabella sono riportate le più comuni patologie dell'apparato locomotore, dovute a difetti dello sviluppo; alcune di queste patologie sono descritte in questo capitolo e nel Capitolo 11.

ni, qualora l'osso alterato ne contenga, come ad esempio l'encefalo e il midollo spinale. L'**acondroplasia** (ACH) è la più comune forma di nanismo (1:26.000 nati vivi); colpisce principalmente le ossa lunghe, ma può essere accompagnata anche da altri difetti, come iposviluppo facciale (Fig. 18-32). La **displasia tanatofora** è la più comune forma letale di nanismo. Ne sono stati descritti due tipi: il tipo I, con femori corti e ricurvi e malformazioni più o meno gravi del cranio, e il tipo II, con femori lunghi e diritti, ma gravi malformazioni del cranio (craniosinostosi). L'**ipocondroplasia** rappresenta una forma lieve di acondroplasia, che non è accompagnata da alterazioni facciali. Per lo più i difetti fin qui descritti sono ereditati in maniera autosomica dominante e la maggior parte compare in maniera sporadica. Sono tutti caratterizzati da alterazioni della segnalazione degli FGF e, in particolare, mutazioni del recettore FGFR3. Abbiamo visto che l'FGF svolge un ruolo fondamentale nella ossificazione endocondrale, quindi tali alterazioni interferiscono con la crescita delle ossa lunghe e di quelle della base del cranio. Mutazioni di geni per altri recettori per l'FGF (R1 o R2) sono invece associati ad altri gruppi di difetti scheletrici cranio-facciali (vedi Capitolo 14). L'**iperpituitarismo** è invece caratterizzato da crescita eccessiva degli arti e del tronco (gigantismo) oppure della faccia, mani e piedi (**acromegalia**). Quest'ultima condizione è causata da una eccessiva produzione dell'ormone della crescita GH.

L'**osteogenesi imperfetta** (OI) è una malattia ereditaria che provoca accentuata fragilità delle ossa. Le persone affette da OI subiscono fratture apparentemente spontanee o in seguito a traumi lievi e le loro ossa possono subire delle deformazioni. Circa l'80-85% delle persone affette da OI ha una alterazione genetica (mutazione) a carico di uno dei due geni delle catene $\alpha 1$ e $\alpha 2$ del tropocollagene situati sui cromosomi 7 e 17, responsabili della produzione del collagene di tipo I. Per comprendere i rischi di trasmissione ereditaria dell'OI è bene distinguere fra casi familiari (che ricorrono cioè all'interno della stessa famiglia) e casi sporadici (cioè casi isolati, che non compaiono più di una volta nella stessa famiglia). Le forme meno gravi (tipo I e IV) hanno talvolta carattere familiare e si trasmettono geneticamente secondo una modalità chiamata autosomica dominante. Questo significa che una persona affetta ogni volta che si riproduce ha il 50% di probabilità di avere un figlio affetto, indipendentemente dal sesso.

### *Difetti vertebrali*

Nel Capitolo 11 abbiamo già menzionato alcune malformazioni congenite vertebrali (CVM), la cui alterazione sembra essere a carico dell'orologio interno dei somiti. Per altri tipi di CVM, come ad esempio la **sindrome di Klippel-Feil** (KFL), ancora non sono chiari i meccanismi molecolari alterati. Tale sindrome è un complesso disordine scheletrico caratterizzato da una fusione congenita delle vertebre cervicali, causata probabilmente da segmentazione anormale delle vertebre durante le prime settimane di sviluppo, per cui è stato postulato un difetto nella somitogenesi. Tuttavia, a tuttora, l'eziologia della KFL è sconosciuta. Sia la sindrome sporadica che quella familiare presentano eterogeneità clinica, con vari gradi di fusione vertebrale, instabilità spinale e con associate altre anomalie cranio-facciali. Recenti studi hanno dimostrato l'associazione di tale patologia con alterazioni cromosomiche del locus che contiene il gene per GDF-9 (growth differentiation factor 9), in alcuni casi, sia sporadici che familiari. In altri pazienti sono state invece riscontrate mutazioni a carico di membri della famiglia dei fattori di trascrizione PAX, in particolare PAX1. Una delle più gravi malformazioni delle vertebre è però rappresentata dalla **spina bifida**. Tale difetto dipende dalla imperfetta o assente fusione degli archi vertebrali. Se il difetto coinvolge esclusivamente la componente scheletrica, il risultato è una **spina bifida occulta**, che non provoca difetti neurologici. Nella **spina bifida cistica**, invece, la mancata fusione degli archi vertebrali è associata a mancata chiusura del tubo neurale, causando un deficit neurologico con livelli di gravità proporzionali all'estensione della lesione (Fig. 18-33).

### *Difetti degli arti*

Difetti nello sviluppo degli arti possono presentarsi come riduzione, duplicazione, per sviluppo di elementi soprannumerari, o anche come **displasie**, per sviluppo anomalo. La riduzione può avvenire per parziale (mero-

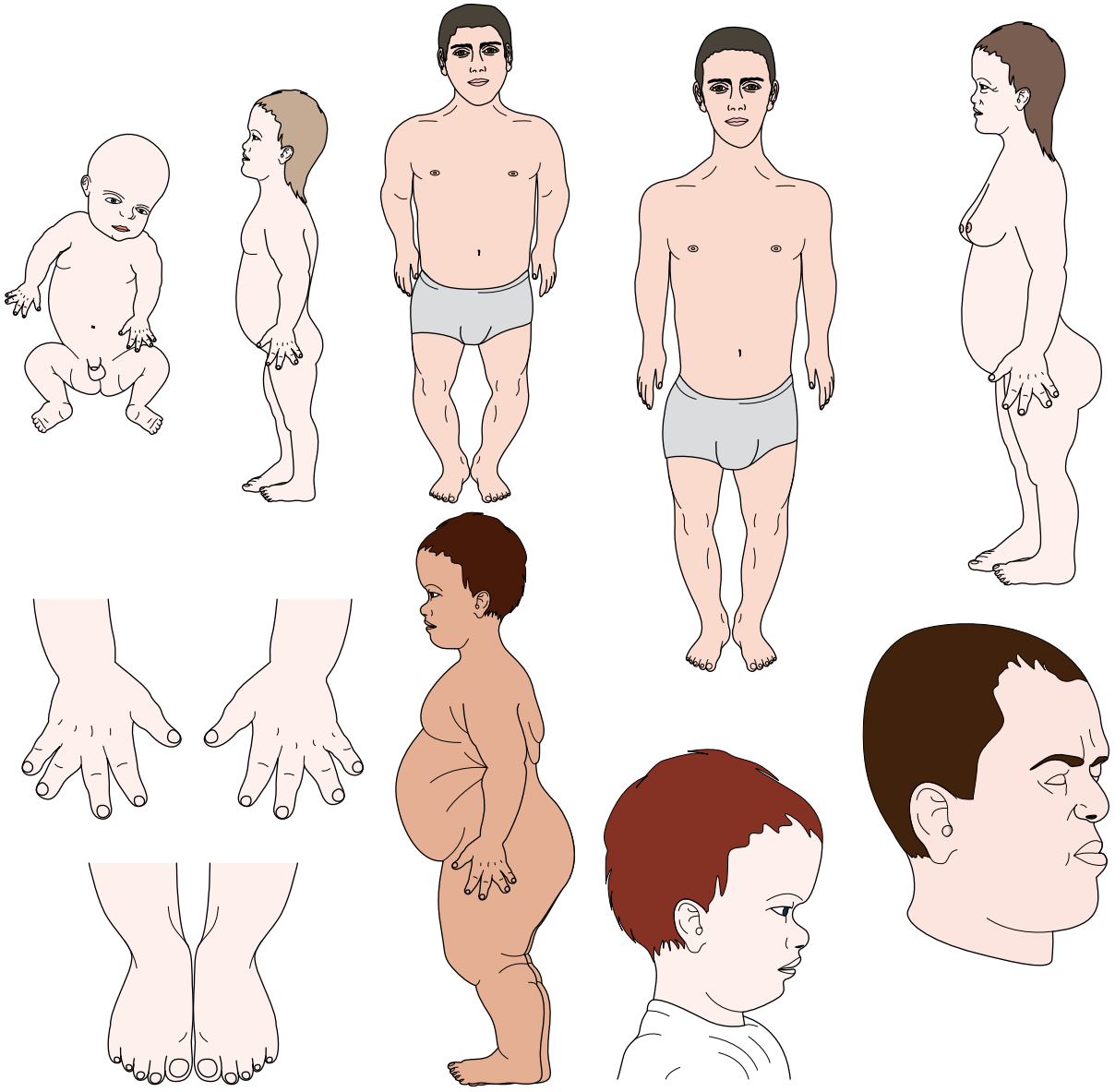


**Figura 18-32** ■ Principali fenotipi di acondroplasia.

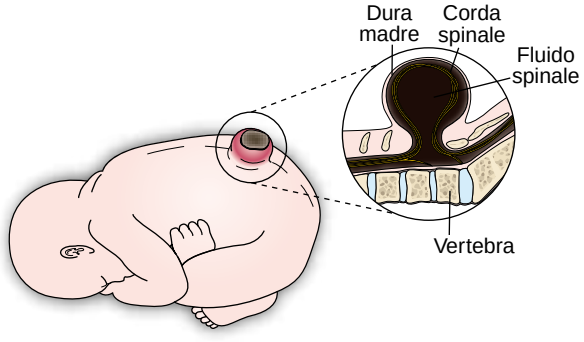



**Figura 18-33** ■ Spina bifida cistica con coinvolgimento del tubo neurale.

melia) o completa assenza (**amelia**) di una o più estremità. In alcuni casi, i segmenti scheletrici sono presenti, ma estremamente corti (micromelia). Una malformazione grave di questo gruppo è rappresentata dalla **focomelia**, dove mancano le ossa lunghe, per cui mani e piedi sono attaccati a piccole ossa deformi (Fig. 18-34). Nonostante siano malformazioni piuttosto rare, la loro eziologia può essere ereditaria, ma anche di origine teratogena. Ben documentata è la focomelia indotta da talidomide, un farmaco utilizzato alla fine degli anni '50 come antidepressivo. Molti bambini nati in quel periodo da madri che avevano assunto il farmaco, presentavano focomelia. Sembra che il talidomide inibisca la proliferazione delle cellule della zona di progressione, impedendo quindi

**Figura 18-34** ■ Neonati focomelici per difetti di sviluppo degli arti superiori ed inferiori. (*Da* G. Canepa, P. Maroteaux, V. Pietrogrande, Sindromi dismorfiche e malattie costituzionali dello scheletro, vol. I, Piccin Nuova Libraria, 1996.)

l'accrescimento prossimo-distale dell'arto. Attualmente è utilizzato nella terapia dell'AIDS e dei tumori, ma, ovviamente, il suo uso in gravidanza deve essere estremamente controllato. Alcuni studi indicano che il periodo più sensibile per l'induzione teratogena di difetti dello sviluppo dell'arto sia compreso fra la quarta e la 5ª settimana di sviluppo.

Un'altra classe di malformazioni dello sviluppo dell'arto comprende le malformazioni a livello delle dita. Difetti di riduzione comprendono le **brachidattilie**, rare e caratterizzate da dita molto corte; il difetto di duplicazione più comune è la **polidattilia**, la presenza dita sopranumerarie, mentre la displasia più frequente è la fusione delle dita, la **sindattilia**. Talvolta sindattilia e polidattilia possono essere combinate producendo **polisindattilia** (Fig. 18-35). Queste anomalie coprono quindi una varietà eterogenea di difetti. La polidattilia può essere ereditaria o indotta da teratogeni. Nella sindattilia, non si ha riassorbimento del mesenchima interdigitale, portando come risultato a un fusione di una o più dita. In alcuni casi si osserva una fusione delle ossa stesse, come nel caso della **mano fessa** o del **piede fesso**, che acquisiscono la forma di una chela. Le cause molecolari di queste anomalie risiedono principalmente in alterazioni

**Figura 18-35** ■ Esempi di polidattilia delle mani e dei piedi. (*Da* G. Canepa, P. Maroteaux, V. Pietrogrande, Sindromi dismorfiche e malattie costituzionali dello scheletro, vol. I, Piccin Nuova Libraria, 1996.)

dell'attività della ZPA, il centro di segnalazione dell'asse antero-posteriore. Alterazioni a livello di geni *Hox* sono associate ad alcune di queste malformazioni: mutazioni del gene *Hoxa13* producono la **sindrome mano-piede genitale**, caratterizzata da fusione delle ossa del carpo, dita sottili e corte e talvolta ipospadia; mutazioni del gene *Hoxd13* causano polisindattilia. Studi genetici su famiglie affette da alcuni sottotipi di queste patologie (come la polidattilia pre-assiale di tipo II e di tipo III, la polisindattilia con pollice trifalangeo e la sindattilia di tipo IV), hanno permesso di associare tali malformazioni a mutazioni puntiformi o duplicazioni di una regione cromosomica (chiamata sequenza regolativa della zona, SRZ) che comprende sequenze codificanti per fattori regolativi dell'espressione di SHH, non ancora chiaramente identificati. Mutazioni puntiformi di questa regione risulterebbe in una espressione ectopica di SHH, producendo una ZPA anteriore e causando così polidattilia. Anche la duplicazione di questa regione porta alla espressione anteriore di SHH e di altri geni importanti nello sviluppo dell'arto (come *Fgf4, Fgf8, Hoxd12* e *Hoxd13*). Alcune malformazioni (restringimenti degli arti, amputazioni) possono essere causate da briglie amniotiche, che risulterebbero da aderenze tra l'amnios e le strutture interessate, o dal distacco di lacerazioni amniotiche. Una alterazione molto comune degli arti è la **lussazione dell'anca**, che consiste in un anormale sviluppo dell'articolazione dell'anca, spesso associata a postura podalica del feto.

## Letture consigliate

Bodo C, Brand-Saberi B. Limb muscle development. Int J Dev Biol 46, 905-914, 2002.

Caetano-Lopes J, Canhão H, Fonseca JE. Osteoblast and bone formation. Acta Reum Port 32, 103-110, 2007.

Cinnamon Y e coll. Characterization of the early development of specific hypaxial muscles from the ventrolateral myotome. Development 126, 4305-4315, 1999.

Cinnamon Y e coll. The sub-lip domain: a distinct pathway for myotome precursors that demonstrate rostral-caudal migration. Development 128, 341-351, 2001.

Cossu G, De Angelis L, Borello U, Berarducci B, Buffa V, Sonnino C, Coletta M, Vivarelli E, Bouche M, Lattanzi L, Tosoni D, Di Donna S, Berghella L, Salvatori G, Murphy P, Cusella-De Angelis MG, Molinaro M. Determination, diversification and multipotency of mammalian myogenic cells. Int J Dev Biol 44, 699-706, 2000.

Denetclaw WF Jr, Christ B, Ordahl CP. Location and growth of epaxial myotome precursor cells. Development 124, 1601-1610, 1997.

Fernandez-Teran M, Ros MA. The apical ectodermal ridge: morphological aspects and signaling pathways. Int J Dev Biol 52, 857-871, 2008.

Gilbert SF. Developmental biology, 8ª ed, Sinauer Associates, 2006.

Grefte S e coll. Skeletal muscle development and regeneration. Stem Cell and Development 16, 857-868, 2007.

Hartmann C. Skeletal development: Wnts are in control. Mol Cells 24, 2, 177-184, 2007.

Huang R e coll. Contribution of single somites to the skeleton and muscles of the occipital and cervical regions in avian embryos. Anat Embryol 202, 375-383, 2000.

Huang R e coll. Sclerotomal origin of the ribs. Development 127, 527-532, 2000.

Hughes SM, Salinas PC. Control of muscle fibre and motoneuron diversification. Curr Opin Neurobiol 9, 54-64, 1999.

Kalcheim C, Cinnamon Y, Kahane N. Myotome formation: a multistage process. Cell Tissue Res 298, 161-173, 1999.

Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen K-S, Mirams M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 40, 46-62, 2008.

O'Rahilly R, Müller F. Human embryology and teratology, Wiley-Lyss, 2001.

Pin CL e coll. Distal regulatory control of MRF4 gene expression in early and late myogenesic cell populations. Dev Dyn 208, 299-312, 1997.

Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, Buckingham M. A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. Nature 435, 16 June, 2005.

Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, Buckingham M. Divergent functions of murine Pax3 and Pax7 in limb muscle development. Genes & Dev 18, 1088-1105, 2004.

Scaal M e coll. SF/HGF is a mediator between limb patterning and muscle development. Development 126, 4885-4893, 1999.

Shellswell GB. The formation of discrete muscles from the chick wing dorsal and ventral muscle masses in the absence of nerves. J Embryol Exp Morphol 41, 269-277, 1977.

Shum L, Nuckolls G. The life cycle of chondrocytes in the developing skeleton. Arthritis Res 4, 94-106, 2002.

Spranger P e coll. Bone dysplasias: an atlas of genetic disorders of skeletal development, 2nd ed, Jurgen W Oxford, England, Oxford University Press, 2003.

Sun M e coll. Triphalangeal thumb-polysyndactyly syndrome and syndactyly type IV are caused by genomic duplications involving the long-range, limb-specific SHH enhancer. J Med Genet, published online 16 Apr 2008.

Swartz ME, Eberhart J, Pasquale EB, Krull CE. EphA4/ephrin-A5 interactions in muscle precursor cell migration in the avian forelimb. Development 128, 4669-4680, 2001.

Tabin C, Wolpert L. Rethinking the proximodistal axis of the vertebrate limb in themolecular era. Genes Dev 21, 1433-1442, 2007.

Tassabehji M e coll. Mutations in GDF6 are associated with vertebral segmentation defects in klippel-feil syndrome. Human Mutation 29, 1017-1027, 2008.

Zakany J, Duboule D. The role of *Hox* genes during vertebrate limb development. Current Opinion in Genetics & Development 17, 359-366, 2007.

19

# Lo sviluppo dell'occhio e dell'orecchio

Rita Canipari e Amelio Dolfi

## CENNI DI ANATOMIA ED ISTOLOGIA DELL'APPARATO VISIVO

### Occhio o bulbo oculare

L'**occhio** permette la percezione visiva trasformando le onde luminose in un segnale nervoso che raggiunge la massima integrazione a livello del SNC. L'**organo della vista**, oltre all'occhio, comprende strutture rappresentate dalla **muscolatura estrinseca**, che permette la motilità del globo oculare, dalle **palpebre**, dalla **ghiandola lacrimale** e dalla **congiuntiva** che formano un sistema di protezione dell'occhio stesso. L'occhio è costituito da tre distinti strati: quello più esterno è la **tonaca fibrosa** con la **sclera** e la **cornea**, quello intermedio è la **tonaca vascolare** o **uvea**, quello interno è la **tonaca nervosa** o **retinica** (Fig. 19-1).

#### Tonaca fibrosa

Rappresenta la tonaca esterna di rivestimento; è costituita da due porzioni: la parte posteriore di connettivo fibroso denso opaco, la sclera, e quella anteriore di connettivo trasparente specializzato, la cornea.

La sclera ha uno spessore di 0,4-1 mm e costituisce i cinque sesti posteriori della tonaca fibrosa; fornisce supporto strutturale all'occhio e permette l'inserzione dei **muscoli estrinseci** per i movimenti del globo oculare.

Il sesto anteriore della tonaca fibrosa è rappresentato dalla cornea che ha un raggio di curvatura più piccolo della sclera. Essa fa parte dell'**apparato diottrico dell'occhio** ed è il principale mezzo di rifrazione; il potere di messa a fuoco della cornea dipende dal raggio di curvatura della sua superficie esterna. La giunzione tra sclera e cornea è nota come **limbo** ed è caratterizzata da una

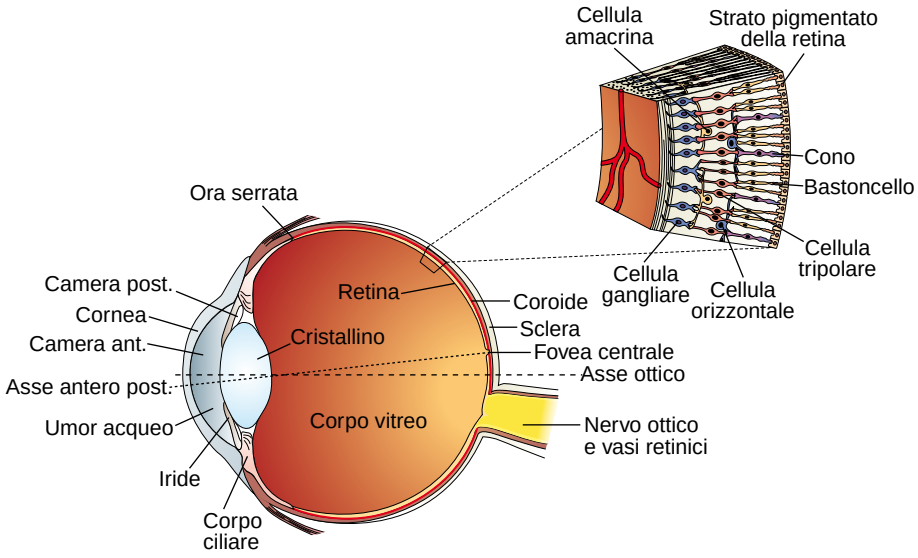



**Figura 19-1** Disegno schematico di una sezione sagittale del globo oculare. Nell'ingrandimento sono mostrati i componenti cellulari della retina.

leggera depressione. La superficie della sclera è ricoperta esternamente dalla **congiuntiva** che si riflette a livello della superficie interna delle palpebre.

## Tonaca vascolare

Denominata anche **tonaca intermedia** o **uvea**, è uno strato molto ricco di vasi, costituito a sua volta da tre componenti che, procedendo dalla parte posteriore del globo oculare verso la parte anteriore sono: la **coroide**, il **corpo ciliare** e l'**iride**.

La coroide è situata tra sclera e **retina**, nei 2/3 posteriori dell'occhio. Essa fornisce supporto alla retina ed è intensamente pigmentata per consentire l'assorbimento della luce.

La coroide si continua anteriormente con il corpo ciliare che inizia a livello della cosiddetta **ora serrata** della tonaca nervosa (vedi più avanti). Il corpo ciliare circonda l'equatore del **cristallino** al quale è connesso mediante l'**apparato sospensore del cristallino**. Il cristallino è una struttura trasparente di forma biconvessa. La sua forma è variabile per consentire la messa a fuoco dell'immagine passata a livello corneale, sulla retina. Il corpo ciliare contiene tessuto muscolare liscio che controlla la forma del cristallino. Il cristallino, l'apparato sospensore e il corpo ciliare dividono l'occhio in un compartimento posteriore più ampio che contiene un gel denso, chiamato **corpo vitreo**, e in un compartimento anteriore che contiene un fluido chiamato **umor acqueo**.

Il terzo componente dell'uvea, l'iride, si trova anteriormente al corpo ciliare e forma un diaframma che si estende sulla superficie anteriore del cristallino, così da dividere, in modo incompleto, il compartimento anteriore in due camere: una **camera anteriore** e una **camera posteriore**. L'iride è intensamente pigmentata e agisce come un diaframma che regola la quantità di luce che può attraversare il cristallino e raggiungere la retina. L'apertura presente a livello dell'iride è chiamata **pupilla**.

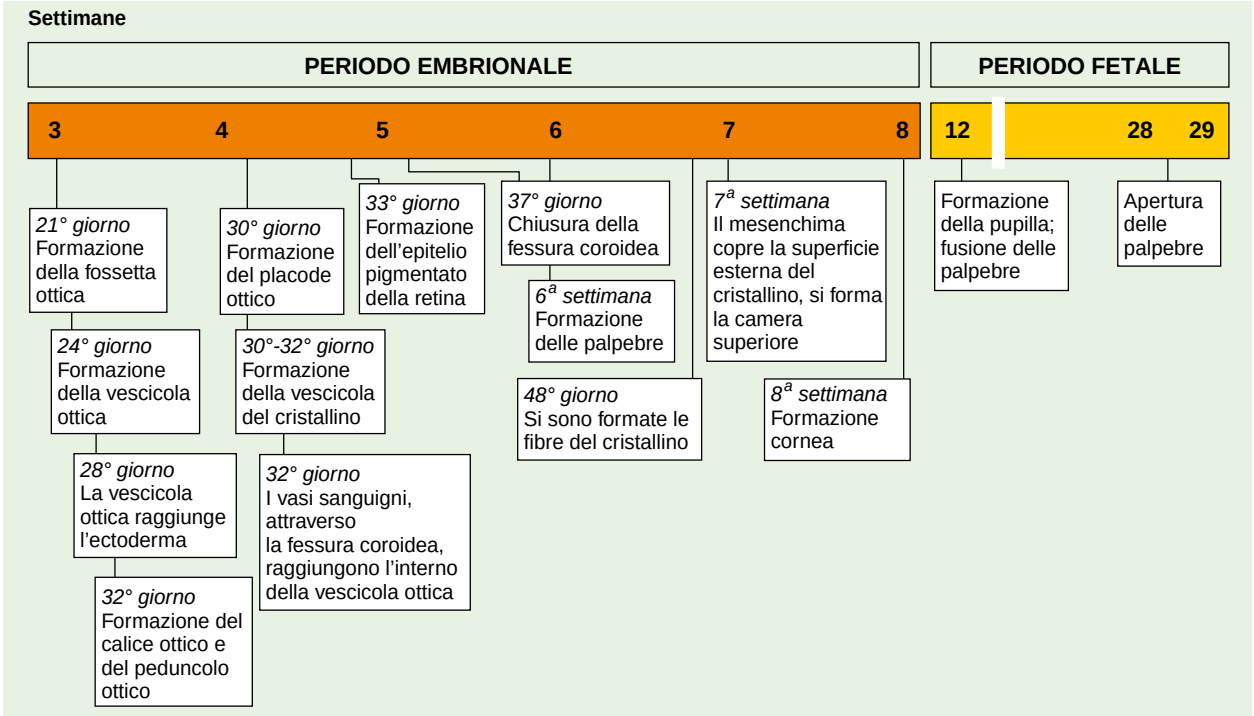
Le due camere del compartimento anteriore contengono l'umor acqueo secreto dal corpo ciliare all'interno della camera posteriore; l'umor acqueo passa nella camera anteriore attraverso la pupilla e viene drenato in un canale posto all'angolo della camera anteriore: il **canale di Schlemm**. L'umor acqueo serve come nutrimento per il cristallino e la cornea, che non sono direttamente vascolarizzati; il liquido agisce come un mezzo ottico e, grazie alla sua pressione, mantiene la curvatura corneale.

Il compartimento posteriore dell'occhio contiene un tipo di tessuto connettivo specializzato che assume la consistenza di un gel trasparente: il corpo vitreo. Con la sua presenza sostiene dall'interno cristallino e retina e rappresenta un mezzo ottico non rifrangente. Il corpo vitreo contiene un canale che si estende dall'uscita del nervo ottico alla superficie posteriore del cristallino: il **canale ialoideo**. Questo rappresenta un residuo dell'**arteria ialoidea** che irrora il corpo vitreo durante lo sviluppo fetale (vedi più avanti).

## Tonaca nervosa

Quasi tutto il compartimento posteriore dell'occhio è rivestito, al suo interno, dalla retina; la retina termina lun-

### TABELLA CRONOLOGICA DELLO SVILUPPO TEMPORALE DELL'OCCHIO



go una linea di aspetto irregolare, dentellato, detta ora serrata che corrisponde, sul piano della tonaca vascolare, al confine tra coroide e corpo ciliare. Anteriormente rispetto all'ora serrata, lo strato retinico prosegue come strato epiteliale non fotosensibile che riveste internamente il corpo ciliare e la superficie posteriore dell'iride.

Nella retina si distingue una zona denominata **fovea centrale** che è l'area di maggiore acuità visiva; in essa converge l'**asse visivo dell'occhio**. La fovea è circondata da una zona gialla, pigmentata, detta **macula lutea**.

I **coni** e i **bastoncelli** della retina rappresentano i recettori visivi costituiti da cellule nervose specializzate a livello citologico. I coni sono disposti principalmente nella **fovea**, parte visiva della retina e servono per la visione diurna; forniscono immagini a colori. I bastoncelli sono situati nella parte periferica della retina e sono deputati alla visione notturna. Nello spessore della retina sono contenuti anche i **neuroni proiettivi** con i loro assoni che andranno a formare il **nervo ottico** e il sistema di **interneuroni** che li unisce assieme (Fig. 19-1, inserto).

Le fibre nervose provenienti dalla retina formano il nervo ottico che esce dal bulbo oculare attraverso una piccola apertura della sclera chiamata **lamina cribrosa**. La parte di retina che ricopre la lamina cribrosa è chiamata **papilla ottica** (o **disco ottico**) e rappresenta un punto cieco privo di fotorecettori.

## PROCESSI DELLO SVILUPPO DELL'OCCHIO

Le strutture anatomiche dell'occhio derivano da tre diverse componenti embrionali: in particolare alcuni tessuti oculari derivano dalla parete del tubo neurale, altri dall'ectoderma e altri dal mesenchima (Fig. 19-2).

### Derivati dal tubo neurale

Verso la fine della 3ª settimana dello sviluppo embrionale, da ciascun lato del **prosencefalo**, nel territorio che nelle fasi successive darà origine al **diencefalo**, compare una fossetta, la **fossetta ottica**. In seguito, verso la fine della quarta settimana, in concomitanza con la chiusura del tubo neurale, la fossetta si trasforma in **vescicola ottica**. A questo punto si tratta di una piccola sfera vuota che protrude dalla parete del prosencefalo e rimane connessa ad esso mediante un peduncolo.

Successivamente, quando si è verificata la suddivisione del prosencefalo in telencefalo e diencefalo, la vescicola rimane connessa col diencefalo per mezzo del **peduncolo ottico**; anch'esso è inizialmente cavo al suo interno. In questo modo la cavità del diencefalo, il **diocele**, si estende all'interno della vescicola ottica (Fig. 19-3).

All'inizio del 2° mese la vescicola ottica subisce una trasformazione; nel suo complesso si invagina e infatti la parete esterna viene ad accostarsi a quella interna dando luogo ad una concavità rivolta verso l'esterno; a questo punto la vescicola si è trasformata in un calice a doppia parete che viene definito **calice ottico**.

Tale processo di invaginazione prende inizio nella parte dorsale e si prolunga verso la parte ventrale fino a portarsi sulla superficie inferiore del peduncolo ottico; in questa sede il processo di invaginazione genera una fessura che viene detta **fessura colobomica** o **fessura coroidea** (Fig. 19-4). La presenza e la temporanea permanenza della fessura sarà determinante per l'ingresso di alcune componenti strutturali nel globo oculare, come l'**arteria ialoidea**, futura **arteria centrale della retina**; verso la fine del 2° mese, dopo aver svolto questo ruolo di passaggio, la fessura si chiuderà.

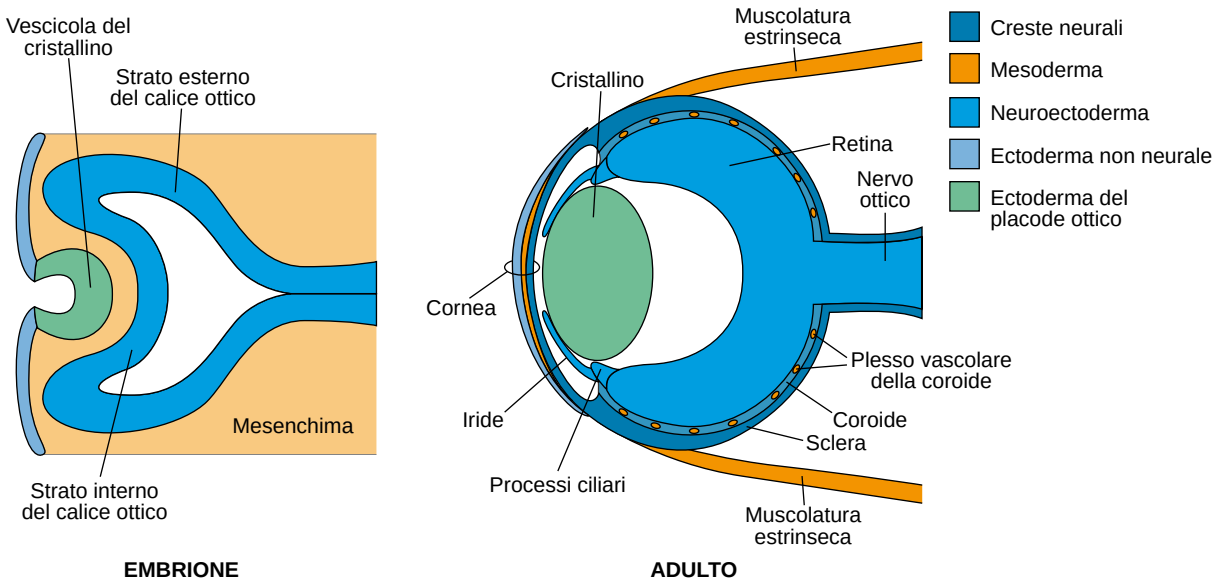



**FIGURA 19-2** ■ Disegno schematico che mostra l'origine embrionale delle varie componenti dell'occhio.

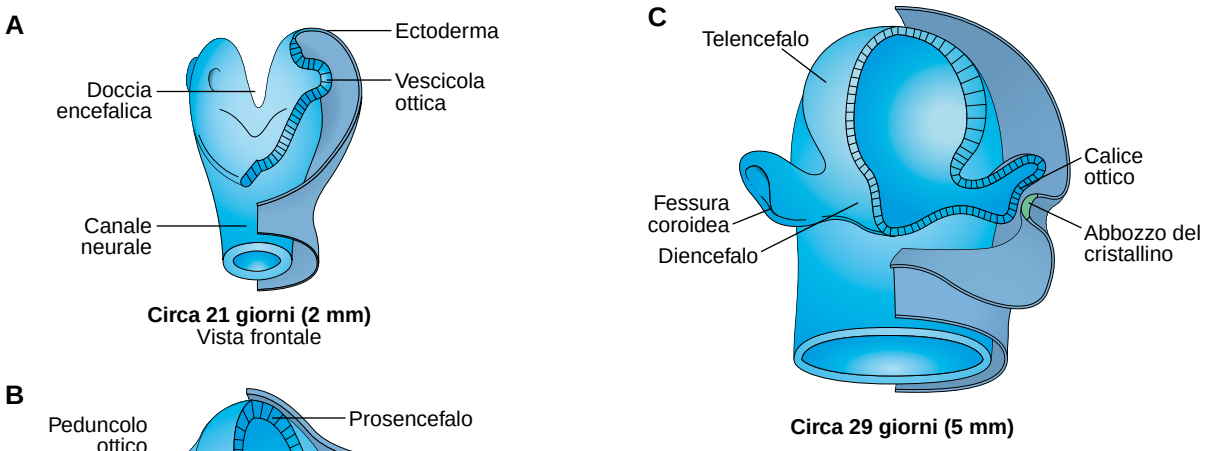



**Figura 19-3** ■ Rappresentazione schematica della faccia anteriore delle vescicole encefaliche e delle prime fasi di sviluppo delle vescicole ottiche. *A)* Embrione di circa 21 giorni. Il neuroporo è ancora aperto e si sono già sviluppate sui lati del tubo neurale due evaginazioni che danno origine alle vescicole ottiche. *B)* In un embrione di 27 giorni il tubo neurale si è chiuso, le vescicole ottiche si sono ingrandite e hanno raggiunto l'ectoderma del placode ottico. *C)* La vescicola ottica si è invaginata a formare il calice ottico e dall'ectoderma comincia ad invaginarsi la vescicola del cristallino.

Il calice ottico (Fig. 19-5) si modifica diversamente nelle sue varie porzioni: nella sua parte anteriore il calice ottico si restringe concentricamente delimitando l'orificio della pupilla. Per quanto concerne lo strato più esterno del calice ottico avrà un destino diverso nella parte posteriore rispetto a quella anteriore; posteriormente diventerà lo strato delle **cellule pigmentate** della retina, mentre nella parte anteriore del globo oculare, vicino all'orificio pupillare, darà origine ai **processi ciliari** e all'iride. Lo strato interno del calice ottico va incontro ad un significativo aumento dello spessore nella porzione posteriore del bulbo oculare dove forma gli strati nervosi della retina. Questi strati si pongono al di sotto delle cellule pigmentate ovvero,

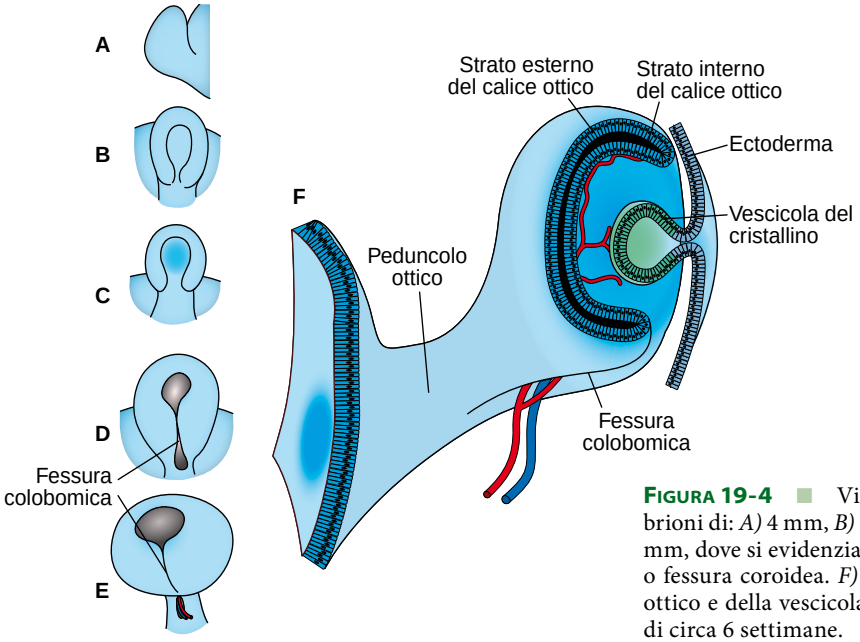



**Figura 19-4** ■ Visione frontale di vescicole ottiche di embrioni di: *A)* 4 mm, *B)* 5,9 mm, *C)* 7 mm, *D)* 10,1 mm ed *E)* 14,2 mm, dove si evidenzia la formazione della fessura colobomica o fessura coroidea. *F)* Visione laterale del calice e peduncolo ottico e della vescicola del cristallino di un embrione umano di circa 6 settimane.

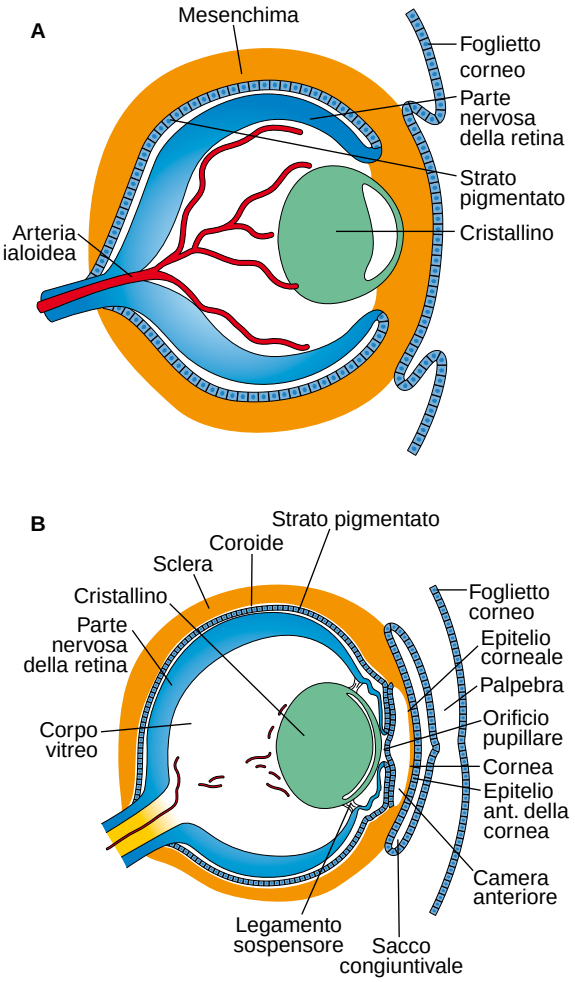



**Figura 19-5** ■ *A)* Sezione sagittale dell'abbozzo oculare di un embrione di circa 13 mm (7 settimane) che mostra l'ulteriore evoluzione dei tessuti che partecipano alla formazione del globo oculare. Il foglietto esterno del calice ottico darà origine all'epitelio pigmentato della retina, mentre il foglietto interno si ispessisce notevolmente e darà origine alla parte nervosa della retina. Tra i due strati è ancora presente lo spazio retinico. Tra il fondo del calice ottico e l'abbozzo del cristallino è visibile l'arteria ialoidea. *B)* Sezione sagittale dell'abbozzo oculare di un embrione di circa 14 settimane. Le palpebre sono notevolmente sviluppate ed i loro margini si sono fusi. La lamina mesenchimale ha formato la sclera e la coroide e i due foglietti del calice ottico, che hanno formato la retina aderiscono l'uno all'altro. L'arteria ialoidea, che inizialmente vascolarizzava il cristallino, regredisce e rimane solo la parte prossimale che dà origine all'arteria centrale della retina.

dall'esterno all'interno si dispongono i **coni** e i **bastoncelli**, le **cellule bipolari** e le **cellule gangliari** (Fig. 19-1, inserto); nella porzione anteriore la parete del calice rimane più sottile e diventa l'epitelio interno dei processi ciliari e dell'iride. Lo **spazio retinico**, che si viene a trovare tra i due strati originari del calice ottico, tenderà a scomparire; questa zona risulterà comunque sempre un'area a minor resistenza come dimostra il fatto che può essere motivo del cosiddetto **distacco della retina**.

I prolungamenti assonici delle cellule ganglionari della retina passano nella fessura colobomica del peduncolo ottico e, quando questa si chiuderà, avrà luogo la formazione del **nervo ottico**.

## Derivati dall'ectoderma

L'ectoderma che si trova al davanti della vescicola ottica va incontro ad un ispessimento e da luogo alla formazione dell'abbozzo del cristallino; in un primo momento la zona ispessita viene detta **placode ottico**; questo si invagina e così diventa la **fossetta cristallina** o **lentogena**; successivamente evolve trasformandosi in **vescicola del cristallino** e allora si separa dall'ectoderma superficiale. A questo punto le cellule che compongono la parete posteriore della vescicola si estendono verso la parete anteriore e così facendo riempiono la cavità della vescicola; in questo modo si forma il corpo del cristallino. Il cristallino continuerà la sua crescita grazie al fatto che le cellule collocate a livello del suo equatore si allungano. La struttura diventa trasparente per la presenza di un contenuto di speciali proteine, chiamate **cristalline**. La crescita del cristallino continua fino all'incirca all'età di 20 anni per aggiunta di nuovo materiale alla sua periferia. L'ectoderma di superficie, che era rimasto a rivestire anteriormente il cristallino, al momento del distacco della vescicola, diventerà l'epitelio anteriore della cornea (Fig. 19-6). Dall'ectoderma derivano anche la **congiuntiva** e le **ghiandole lacrimali** che sono annesse ad essa. La formazione delle palpebre avviene successivamente ad opera di due pliche cutanee; queste sono inizialmente fuse tra loro e si aprono verso il 7°-8° mese.

## Derivati dal mesenchima

All'inizio del 2° mese, il tessuto di natura mesenchimatica che circonda il globo oculare primitivo si porta nell'interno del calice ottico passando attraverso la fessura colobomica. Da esso derivano essenzialmente gli strati della **tonaca fibrosa** e della **tonaca vascolare**. Il suo destino è diverso nelle varie porzioni del calice ottico. Nella zona periferica del calice ottico formerà la coroide e, all'esterno di essa, la **sclerotica**; nella parte anteriore darà luogo alla formazione dello stroma dei **processi ciliari** e dell'iride; nel mesenchima posto fra la cornea ed il cristallino si forma una cavità che divide la camera anteriore dell'occhio; il mesenchima è suddiviso da tale cavità in uno strato più interno, sottile, la **membrana irido-pupillare** che è destinata a scomparire ed in uno strato più esterno, spesso, in continuità con la sclera.

Nella porzione posta all'interno del calice ottico, il mesenchima darà origine al corpo vitreo; contribuisce inoltre alla formazione del tessuto connettivo delle palpebre e degli spazi connettivali nel contesto del nervo ottico. Nel mesenchima fanno precocemente la loro comparsa dei vasi tra i quali l'**arteria ialoidea**. Durante la vita fetale il ramo di questa arteria che arriva al cristallino degenererà e rimarrà solo il ramo che diventerà l'**arteria centrale della retina** (Fig. 19-5B).

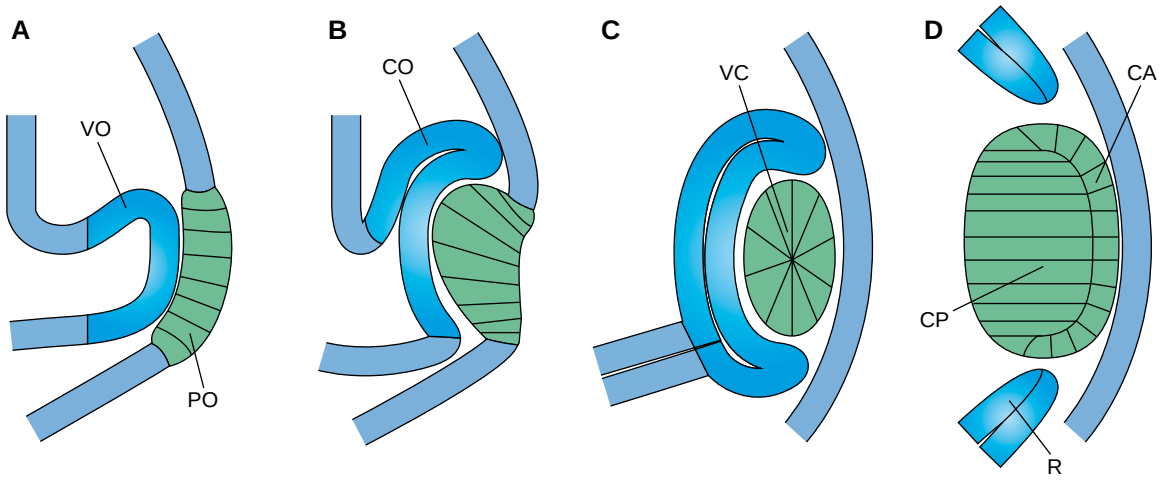



**Figura 19-6** ■ Disegno schematico che mostra *A)* l'evoluzione del placode ottico, *B)* la formazione della fossetta cristallina, *C)* la formazione della vescicola del cristallino e *D)* il cristallino formato. PO = placode ottico, VO = vescicola ottica, CO = calice ottico, VC = vescicola del cristallino, R = retina, CP = cristallino posteriore, CA = cristallino anteriore.

## PROCESSI E MOLECOLE

### *Sviluppo della regione pre-placodi*

Nei vertebrati i gangli e gli organi di senso della testa hanno una doppia origine. Derivano infatti, sia dalle cellule delle **creste neurali** che dalle cellule dei **placodi**. Entrambe le strutture contribuiscono alla formazione dei gangli cranici mentre la maggior parte dei componenti degli organi di senso deriva dai placodi. Le cellule delle creste neurali e quelle dei placodi derivano dall'ectoderma ed hanno uno sviluppo simile. Così come le cellule delle creste neurali anche le cellule progenitrici dei placodi si originano al confine tra la piastra neurale e l'epiectoderma e richiedono per il loro differenziamento l'azione combinata di fattori che inducono la neurulazione, ma anche fattori legati alla formazione dell'asse antero-posteriore dell'embrione. Le cellule progenitrici dei placodi sono infatti escluse dalla porzione più caudale mentre le cellule delle creste neurali sono escluse dalla posizione più anteriore dell'embrione (Fig. 19-7).

Abbiamo già visto nei Capitoli 10 e 12 come per lo sviluppo delle creste neurali sia importante il BMP (bone morphogenetic protein) prodotto dall'ectoderma non neuronale. I livelli di BMP, a cui risultano esposte queste cellule disposte al confine del neuroectoderma, le rendono competenti a rispondere a molecole provenienti dal mesoderma parassiale, WNT8C e FGF, e dall'ectoderma non neuronale, WNT, che ne inducono il differenziamento in cellule delle creste neurali.

Le cellule che si trovano nella porzione più cefalica dell'embrione risentono, tuttavia, dell'influenza di un'altra regione, importante per lo sviluppo delle strutture cefaliche, l'AVE (vedi Capitolo 10) che, producendo molecole con azione antagonista per WNT e BMP quali CER-I (cerberus 1 homolog), attenua la risposta a WNT e BMP e permette all'FGF prodotto dal mesoderma sottostante di attivare una cascata di segnali che spinge questa regione a differenziarsi in regione dei pre-placodi anziché in creste neurali (Fig. 19-8).

Recentemente sono stati identificati alcuni geni che codificano per fattori di trascrizione la cui espressione è

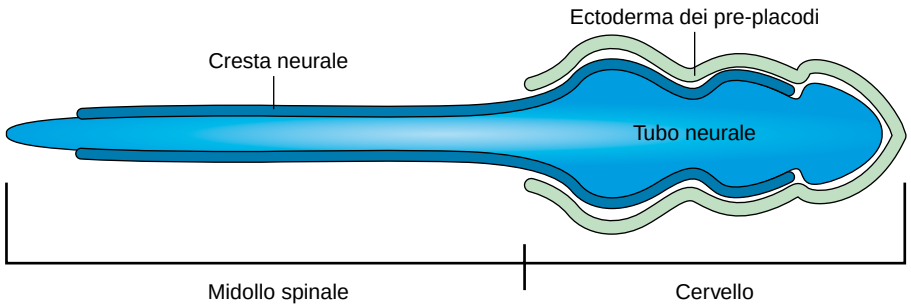



**Figura 19-7** ■ Schema della disposizione spaziale dell'ectoderma dei preplacodi (in verde) lungo l'asse cefalo caudale dell'embrione.

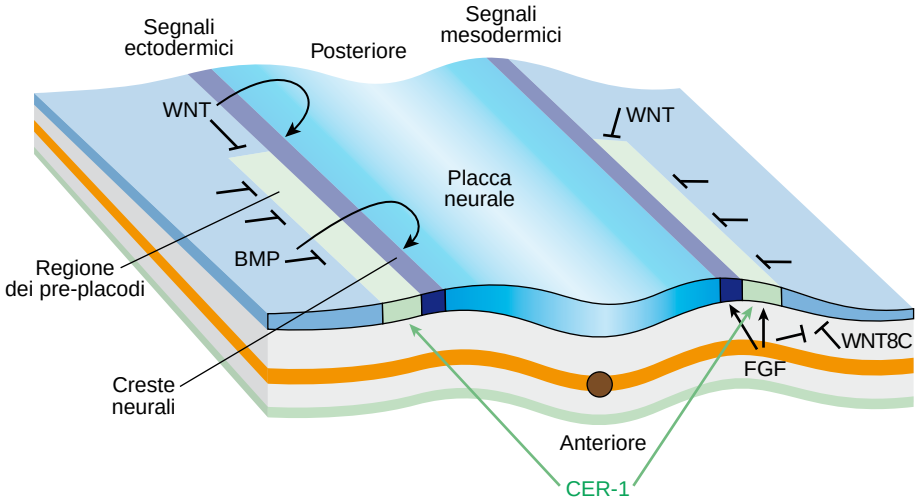



**Figura 19-8** ■ Processi regolativi nella formazione delle cellule della regione dei pre-placodi. Il processo induttivo è mediato da segnali provenienti sia dall'ectoderma non neuronale, evidenziati a sinistra, che dal sottostante mesoderma, a destra. La regione dei pre-placodi è circondata da segnali inibitori provenienti lateralmente (BMP) e posteriormente (WNT) dall'ectoderma, e WNT8C, prodotto dal mesoderma. Le cellule che si trovano nella porzione più cefalica dell'embrione risentono dell'influenza di un'altra regione, importante per lo sviluppo delle strutture cefaliche, l'AVE (vedi Fig. 9-10) che, producendo molecole con azione antagonista per WNT e BMP quali CER-I (cerberus 1 homolog), attenua la risposta a WNT e BMP e permette all'FGF prodotto dal mesoderma di attivare una cascata di segnali che spinge questa regione a differenziarsi in regione dei pre-placodi anziché in creste neurali.

localizzata nell'intera regione a ferro di cavallo della porzione cefalica dell'embrione, corrispondente alla regione dei pre-placodi. Tali geni codificano per la famiglia dei fattori di trascrizione **DLX**, **SIX** (six homeobox) ed **EYA** (eyes absent homolog).

Da questa regione comune si origineranno quindi tutti i placodi in base alla loro posizione rispetto all'encefalo in sviluppo che ne determina il destino successivo. La regione anteriore dà origine ai **placodi olfattori** da cui si originano i neuroni e le cellule della glia dell'epitelio sensitivo del sistema olfattivo, più caudalmente troviamo i **placodi ottici** che daranno origine alla lente del cristallino in corrispondenza della vescicola ottica; questi sono gli unici placodi che non daranno origine a cellule nervose. Di seguito si trovano i **placodi oftalmici** e quello del trigemino che daranno origine ai gangli del trigemino, e più caudalmente troviamo i **placodi otici** che daranno origine all'epitelio specializzato dell'orecchio interno e i **placodi epibranchiali**, che daranno origine ai neuroni sensitivi dei nervi facciale, glossofaringeo e vago (Fig. 19-9).

## Differenziamento del cristallino

Come abbiamo già detto, il cristallino si sviluppa dal placode ottico (Fig. 19-6). Studi dei primi anni del 1900 facevano pensare che la vescicola ottica fosse responsabile del differenziamento dell'ectoderma nei placodi ottici. Trapiantando infatti la vescicola ottica sotto l'ectoderma, Lewis, nel 1904, ottenne lo sviluppo del cristallino in posizione ectopica. È solo più tardi, nel 1990, che Henry e Grainger evidenziarono come l'ectoderma cefalico che avrebbe dato origine al cristallino cominciava il suo differenziamento già prima del contatto con la vescicola ottica. Infatti, l'ectoderma del placode ottico può dare origine al cristallino anche in assenza della vescicola ottica. Nel loro modello questi autori hanno proposto che segnali provenienti dal margine anteriore della placca neurale in formazione e segnali provenienti dal sottostante endo-mesoderma siano in grado di indurre un primo cambiamento dell'ectoderma verso lo sviluppo del cristallino senza la necessità dell'interazione con la vescicola ottica. Tuttavia, la vescicola ottica è indispensabile per il completo sviluppo e il mantenimento del cristallino, infatti se si rimuove la porzione di vescicola ottica a contatto con l'ectoderma, il cristallino va incontro ad un processo degenerativo. Nello stesso tempo il cristallino è responsabile del corretto differenziamento della vescicola ottica.

Il differenziamento del cristallino è un processo che avviene in diverse fasi e che prevede l'attivazione sequenziale di geni che codificano per diversi fattori di trascrizione. Un primo gruppo di geni si attiva nella regione del pre-placode, ed è quindi comune a tutti i placodi. Tra questi i geni della famiglia ***Dlx*** (related to the Drosophila distal-less, *Dll*, gene), ***Hes*** ed ***Eya***. Un secondo gruppo comprende geni specifici per lo sviluppo del cristallino, ***Pax6*** (paired box 6) e ***Six3*** (six homeobox 3), un terzo gruppo include i geni responsabili della morfogenesi del cristallino dopo il contatto con la vescicola ottica, ***Sox2*** e ***3*** (SRY-related HMG-box) e gli omeobox ***Meis1*** e ***2***.

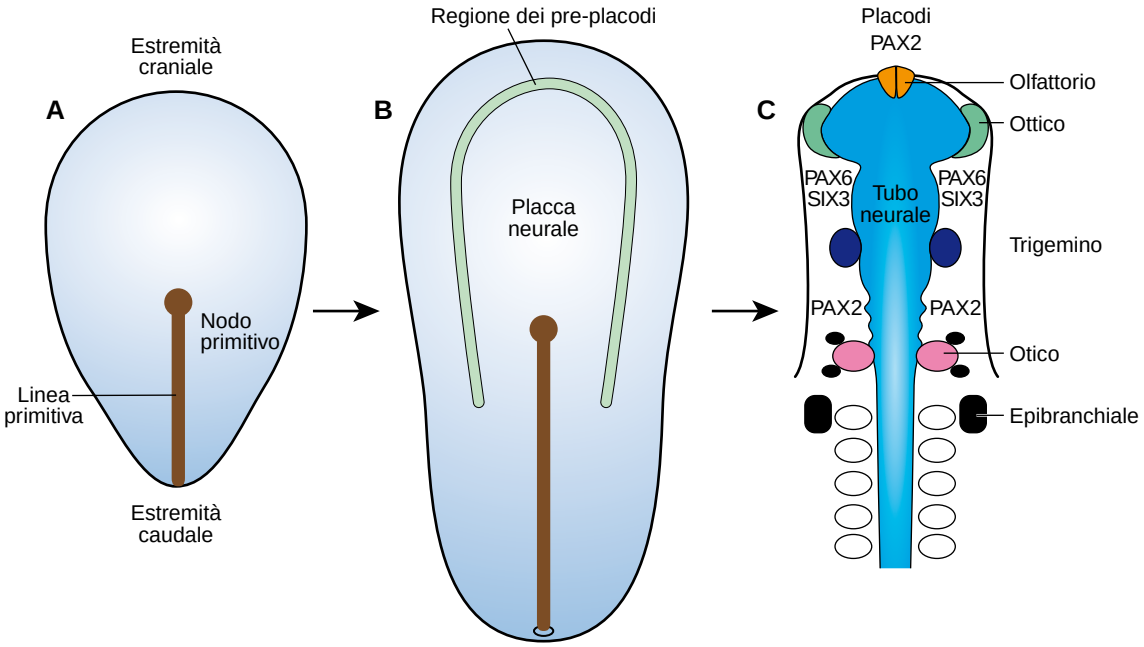



**Figura 19-9** ■ Visione dorsale del disco embrionale durante lo sviluppo dei placodi. *A)* Embrione prima del differenziamento dell'area dei pre-placodi. *B)* Differenziamento nella regione cefalica dell'embrione dell'ectoderma dei preplacodi posto alla periferia della placca neurale. *C)* Differenziamento di questa area in: placodi olfattori, ottici, del trigemino, otici ed epibranchiali.

Lo sviluppo del placode ottico appare inizialmente associato al placode olfattivo, nella regione più craniale dell'ectoderma. Tale regione comune esprime il fattore di trascrizione **PAX6**. La separazione di questa porzione in due distinti abbozzi ottici laterali, placodi ottici, e una zona centrale, il placode olfattivo, è innescata da segnali provenienti dalla placca precordale che secerne **sonic hedghog** (**SHH**). SHH induce anteriormente l'espressione di ***PAX2*** dando origine al placode olfattivo, mentre l'espressione di *PAX6* rimane segregata lateralmente nei due placodi ottici (Fig. 19-9). In caso di mancata azione di SHH il processo rimane indiviso causando oloprosencefalia o ciclopia (sia nell'uomo che in altri vertebrati). *PAX6* ha un alto grado di omologia in diverse specie, dalla Drosofila all'uomo. Si conosce una mutazione a carico del gene nella Drosofila, chiamata *eyeless,* mentre nel topo la mutazione, conosciuta come *small eyes*, causa allo stato eterozigote microftalmia. Questa mutazione è presente anche nell'uomo, e mutanti eterozigoti presentano un ampio spettro di difetti oculari come l'aniridia, con assenza parziale o totale dell'iride a volte associata a cataratta, glaucoma, ipoplasia foveale. PAX6 è inoltre essenziale per l'induzione di **SOX2**, un marcatore del differenziamento del cristallino e controlla anche l'espressione di altri geni regolatori del cristallino quali il già menzionato ***Six3*** e ***Prox1*** (omologo del gene homeobox prospero di Drosophila). La produzione di **BMP-4**, da parte della vescicola ottica, sostiene quindi l'espressione sia di SOX2 che di un altro fattore di trascrizione **L-MAF** (lens-musculoaponeurotic fibrosarcoma) nelle cellule del cristallino. L'espressione coordinata di questi geni è importante nello sviluppo del cristallino in quanto essi controllano l'espressione dei geni responsabili della formazione delle cristalline, le proteine tipiche del cristallino. Una volta che la vescicola del cristallino si è formata, altri fattori prodotti dalla vescicola ottica ne mantengono la struttura e ne inducono crescita e ulteriore differenziamento. Per esempio l'**FGF** induce il differenziamento delle cellule della regione posteriore del cristallino che darà origine a fibre allungate (corpo del cristallino) mentre la parete anteriore, esposta a livelli più bassi di FGF, manterrà la sua attività proliferativa grazie anche all'espressione di ***FOXE3***. Nella regione equatoriale di transizione verrà espresso il gene *Prox1*, responsabile invece dell'uscita delle cellule dal ciclo cellulare. Una mancata espressione di *Fox3* nel topo causa un difetto nel cristallino che non si distacca dall'ectoderma della cornea. In questa condizione, l'espressione di *Prox1* si espande dalla regione equatoriale anche nella regione anteriore che smette di proliferare per prematuro differenziamento. Questo difetto osservato nei topi dyl (dysgenetic lens) somiglia ad una patologia di disgenesia della porzione anteriore dell'occhio umano chiamata anomalia di Peter. Pazienti che presentano questo difetto spesso hanno una mutazione nel gene *FOXE3*.

## Differenziamento della vescicola ottica

La vescicola ottica contiene progenitori che daranno origine sia alle cellule della retina nervosa che alle cellule

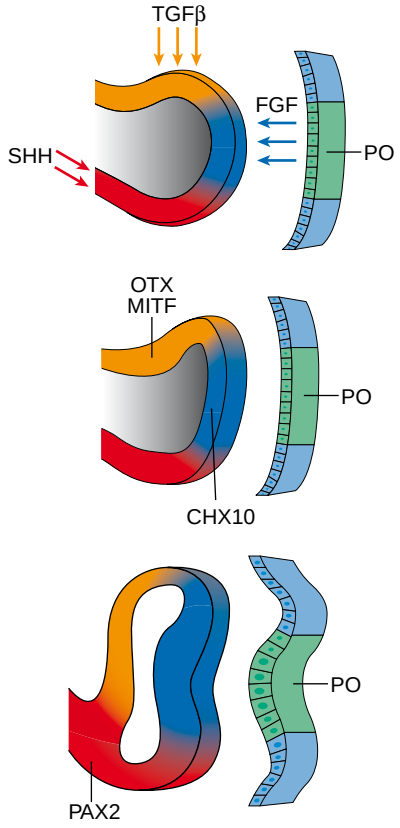



**FIGURA 19-10** ■ Influenza dell'ectoderma del placode ottico e dei tessuti circostanti sullo sviluppo della vescicola ottica e del calice ottico nell'embrione di topo. Il processo differenziativo è mediato dall'FGF (secreto dal placode ottico, PO), dal TGFβ (secreto dalle cellule mesenchimali) e da SHH (secreto dalla notocorda e dalla porzione ventrale del romboencefalo).

pigmentate della retina. Per lo sviluppo della vescicola ottica sono importanti le interazioni con i tessuti circostanti. Il tessuto ectodermico grazie alla secrezione di fattori di crescita **FGF** induce l'espressione del gene ***Chx10*** che guida lo sviluppo dello strato interno della retina (retina nervosa), mentre il **TGFβ** (transforming growth factor-β) prodotto dalle adiacenti cellule mesenchimali, induce la formazione dello strato esterno della retina (strato pigmentato) inducendo l'espressione dei fattori di trascrizione ***MITF*** e di ***OTX***. L'SHH prodotto dalla notocorda induce la formazione ventrale della vescicola ottica inducendo PAX2 e dando origine al peduncolo ottico (Fig. 19-10). Una volta che si è determinato il differenziamento dei due strati della retina la vescicola ottica comincia ad invaginarsi per formare il calice ottico. Questa invaginazione è dipendente dalla presenza del cristallino. Infatti in sua assenza il calice ottico non si forma.

La retina dei vertebrati è composta da sei tipi di neuroni e un tipo di cellule della glia. Questi differenti tipi cellulari si differenziano con un ordine ben definito e sequenziale da un precursore multipotente residente nello strato interno. Il differenziamento inizia nella fovea centrale grazie all'induzione dell'FGF proveniente dal peduncolo ottico. Le prime cellule che si differenziano sono i coni, le cellule orizzontali, e le cellule gangliari i cui assoni vanno a costituire il nervo ottico. Di seguito si formano i bastoncelli e le cellule amacrine, e per ultime si differenziano le cellule bipolari. Numerosi fattori sono stati implicati nella neurogenesi di queste cellule. Tra questi, fattori secreti quali FGF, SHH ed EGF, contatti cellulari mediati dall'interazione Notch/delta, e anche fattori intrinseci quali vari fattori di trascrizione **bHLH** (basic helix loop helix). Alcuni di questi come **HES1** e **HES5** (hairy and enchancer of split 1 e 5) indotti da Notch mantengono la proliferazione cellulare, altri come **MASH1**, **NGN2** (neurogenin2) e **MATH5** sono richiesti per il differenziamento dei vari tipi di neuroni.

Questo differenziamento è regolato anche da PAX6 prodotto dal peduncolo ottico, che, insieme ai geni *Hes* mantiene la multipotenza dei precursori.

## Origine e differenziamento del mesenchima oculare

Il mesenchima che andrà a circondare il globo oculare deriva in gran parte dalle cellule delle creste neurali, e in minor parte dal mesoderma parassiale craniale. I meccanismi che ne controllano la migrazione e il differenziamento sono ancora poco conosciuti. Dati classici di trapianto di tessuti hanno evidenziato che lo sviluppo della cornea e della camera anteriore dipendono da segnali induttivi provenienti dal cristallino. Inoltre, mutazioni in geni espressi nel cristallino e nel placode ottico portano a difetti non solo nella lente, ma anche nelle strutture derivanti dal mesenchima. Infatti, difetti primari nella sua formazione sono solitamente associati a malformazioni dei tessuti derivanti dal mesenchima. Studiando il fenotipo di individui con difetti nell'espressione di PAX6, sia nell'uomo che nel topo, appare evidente che una corretta espressione di questo gene è richiesta per il differenziamento di tutti i tessuti dell'occhio anteriore di origine mesodermica.

Inoltre, abbiamo già visto che durante il differenziamento del cristallino vengono espressi geni come: *Maf, Foxe3* e *Pitx3*. Mutazioni a carico di questi geni nell'uomo portano a difetti nel cristallino, ma anche nella cornea e nell'iride causando cataratta congenita, coloboma dell'iride (vedi più avanti), opacità delle cornee nell'anomalia di Peter e adesione fra iride e cornea.

# ASPETTI CLINICI

## Malformazioni oculari

Le malformazioni oculari più importanti possono essere distinte in alterazioni dell'organogenesi oculare e malformazioni secondarie.

### ALTERAZIONI DELL'ORGANOGENESI OCULARE

*Ciclopia* Si tratta della presenza di un solo occhio o di due occhi fusi sulla linea mediana; questa malformazio-

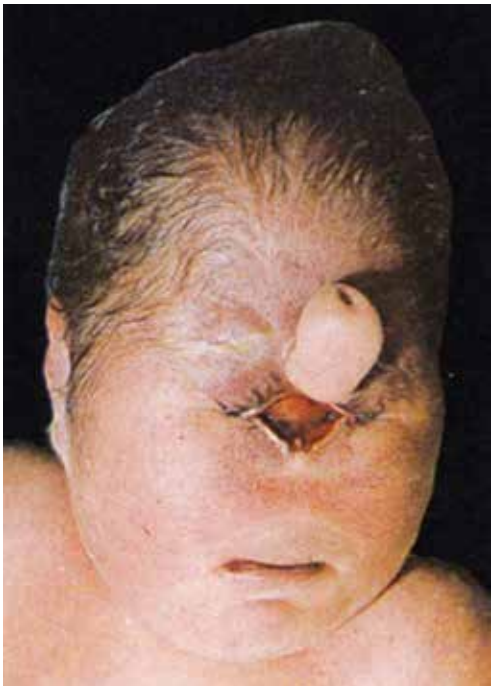


**Figura 19-11** ■ Fotografia della testa di un feto a termine affetto da ciclopia. (*Da* G. Canepa, P. Maroteaux, V. Pietrogrande, Sindromi dismorfiche e malattie costituzionali dello scheletro, vol. I, Piccin Nuova Libraria, 1996.)

ne non si presenta in forma isolata ma fa parte di sindromi malformative complesse che interessano il sistema nervoso (**ciclocefalia**) (Fig. 19-11).

*Anoftalmia* Assenza di uno o di entrambi i globi oculari; sono presenti le palpebre e i muscoli oculomotori perché derivati indipendentemente dall'occhio. Si associa a malformazioni del cranio e dell'encefalo. Può essere indotta da alcuni farmaci (sulfamidici) e da disvitaminosi (carenza di acido pantotenico, ipervitaminosi A).

*Microftalmia* Il globo oculare e il cristallino sono di dimensioni ridotte.

*Cataratta congenita* È una malformazione frequente che può consistere in opacità parziale o totale dei cristallini. Spesso è causata dalla rosolia contratta dalla madre in gravidanza.

*Coloboma* Consiste nella persistenza della fessura coroidea oltre la 7ª settimana; può essere più o meno estesa interessando retina e iride (Fig. 19-12).

### *Malformazioni secondarie*

*Glaucoma congenito* È la più diffusa delle malformazioni del globo oculare. Spesso è bilaterale e responsabile di cecità dell'infanzia. È dovuto alla persistenza di tessuto mesenchimale nell'angolo irido-corneale. In conseguenza di ciò si verifica un impedimento alla circolazione dell'umore acqueo che viene secreto dai processi ciliari e riassorbito a livello dell'angolo irido-corneale dal canale di Schlemm. L'alterata circolazione dell'umore acqueo determina un'ipertensione oculare e una degenerazione più o meno rapida del nervo ottico dovuta a compressione.

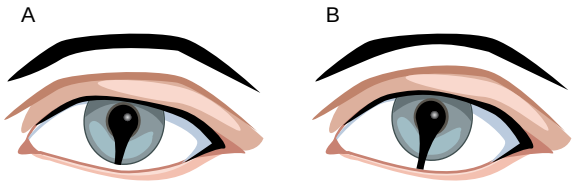



**Figura 19-12** ■ Schema che mostra i risultati della persistenza della fessura coroidale. *A)* Coloboma dell'iride. *B)* Coloboma dell'iride e della coroidea.

## CENNI DI ANATOMIA ED ISTOLOGIA DELL'APPARATO UDITIVO

L'apparato uditivo è suddiviso in tre parti che sono rappresentate da **orecchio esterno**, **orecchio medio** e **orecchio interno** (Fig. 19-13).

### Orecchio esterno

La prima parte dell'apparato uditivo è costituita da un **condotto** che serve per convogliare le onde sonore verso la **membrana timpanica**. La prima porzione del condotto è costituita dal **padiglione auricolare** che è formato da tessuto cartilagineo di tipo elastico ricoperto dall'epidermide; esso si continua con il **meato acustico esterno** che inizia con una struttura di tipo cartilagineo e poi si continua nel contesto dell'osso temporale fino alla membrana del timpano. L'epidermide riveste anche il meato costituendo un tessuto cutaneo dove risultano abbondanti i peli e le **ghiandole ceruminose**.

### Orecchio medio

La **membrana del timpano** separa il meato uditivo dall'orecchio medio; quest'ultimo è rappresentato da una cavità ossea alloggiata nella rocca petrosa dell'**osso temporale**. Nell'orecchio medio è localizzata la catena degli ossicini: **martello**, **incudine** e **staffa**. Gli ossicini vengono messi in movimento dalle vibrazioni della membrana timpanica generate dalle onde sonore. La staffa poggia su un'apertura ossea (**finestra ovale**) che permette di trasmettere il movimento degli ossicini al liquido che si trova nell'orecchio interno (**endolinfa**, vedi più avanti). La membrana timpanica e la staffa sono collegate alle pareti della cavità timpanica da ligamenti e da due piccoli muscoli rappresentati rispettivamente dal muscolo **tensore del timpano** e dal muscolo **stapedio**. La funzione di questi piccoli fasci muscolari è quella di modulare i movimenti e quindi le vibrazioni che vengono trasmesse all'orecchio interno. La cavità del timpano comunica con il **rinofaringe** per mezzo di un condotto

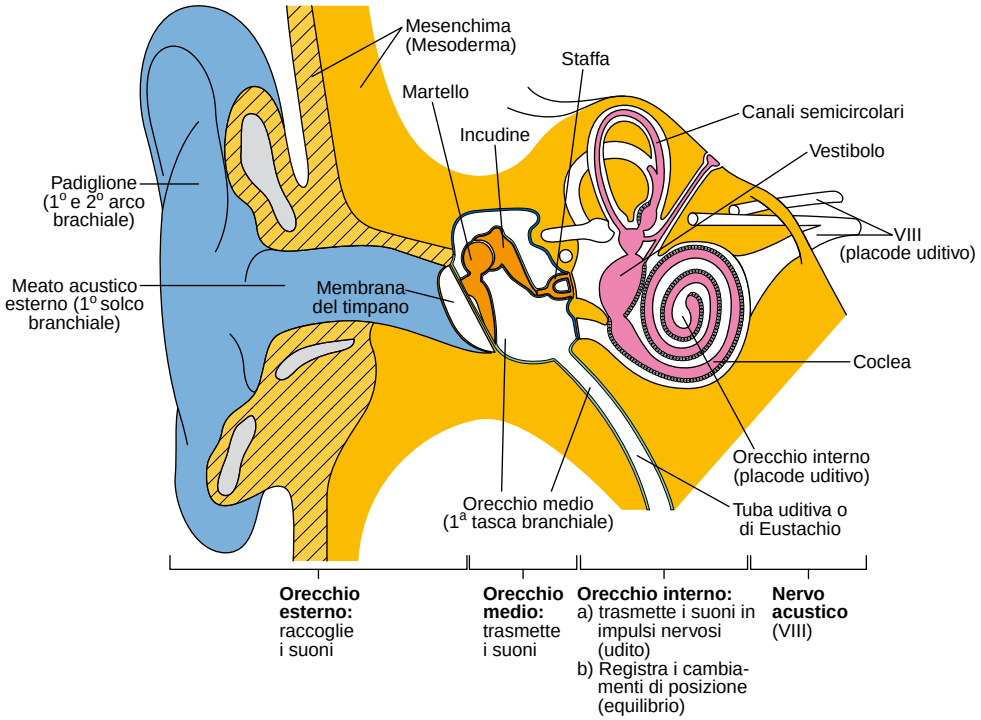



**Figura 19-13** ■ Disegno schematico dell'apparato uditivo. Sono evidenziate le tre parti in cui lo si può suddividere e che sono rappresentate da: orecchio esterno, con il padiglione auricolare e il meato uditivo esterno, orecchio medio e orecchio interno.

definito **tuba uditiva** o **di Eustachio** e, a livello posteriore, con le **cavità mastoidee** contenute nell'apofisi mastoidea dell'osso temporale. Le cavità mastoidee e la cavità dell'orecchio medio sono tappezzate in prevalenza da un epitelio cubico e, in alcune zone diverse, da un epitelio pavimentoso semplice.

## Orecchio interno

L'orecchio interno si compone di un *labirinto osseo* scavato nell'osso temporale e di un **labirinto membranoso** che è accolto all'interno di quello osseo. Il labirinto membranoso è un sistema chiuso che contiene al suo interno un liquido definito endolinfa. Inoltre il labirinto membranoso si allarga in un'espansione detta **sacco endolinfatico** alloggiato nello spazio subdurale. Il sacco endolinfatico è rivestito da un epitelio assorbente mentre la parte rimanente del labirinto membranoso è rivestita da un epitelio di tipo semplice; fanno eccezione le aree sensoriali (**macule** e **creste ampollari**) a livello delle quali si trova un epitelio di tipo sensoriale.

Lo spazio compreso tra osso e labirinto membranoso è detto **spazio perilinfatico**; esso contiene un liquido denominato **perilinfa** di composizione simile al **liquido cefalorachidiano** a sua volta contenuto negli spazi sub aracnoidei. Lo spazio perilinfatico comunica infatti con gli spazi subaracnoidei.

Il labirinto osseo viene suddiviso in una porzione centrale definita **vestibolo** da cui prendono origine, all'indietro tre **canali semicircolari** e, verso l'avanti, la **coclea**.

### Vestibolo

La superficie laterale del vestibolo è in rapporto con la cavità del timpano (orecchio medio) dalla quale è separata da una parete ossea che presenta due aperture definite rispettivamente **finestra rotonda**, situata più avanti e ricoperta da una membrana, e **finestra ovale**, posta più indietro, su cui poggia la staffa terminale della catena degli ossicini contenuti nell'orecchio medio. Le vibrazioni vengono trasmesse dalla staffa dell'orecchio medio all'endolinfa contenuta nel labirinto membranoso tramite la finestra ovale; la finestra rotonda dissipa l'energia trasmessa dalle vibrazioni stesse all'endolinfa grazie all'elasticità della membrana che la ricopre.

All'interno del vestibolo sono contenute due strutture membranose ovvero l'**utricolo** ed il **sacculo** comunicanti tra loro. A livello delle loro pareti si trovano due aree specializzate dette **macule** nelle quali abbondano cellule sensoriali (**statocinetiche**) raggiunte da fibre del **nervo vestibolare** (Fig. 19-14).

### Canali semicircolari

I tre canali semicircolari si dipartono dalla porzione posteriore del vestibolo, due sono disposti sul piano verticale, ad angolo retto l'uno rispetto all'altro, mentre il terzo è disposto pressoché su un piano orizzontale.

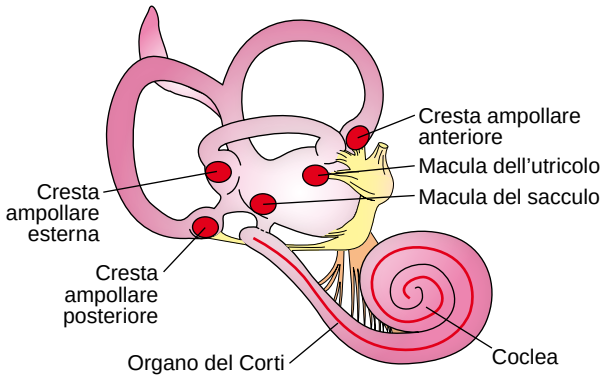



**Figura 19-14** ■ Schema della localizzazione delle sei regioni dell'orecchio interno che daranno origine alle regioni sensoriali.

Ciascun canale semicircolare contiene un condotto membranoso che assume lo stesso decorso; questo viene definito **canale semicircolare membranoso**. Ognuno dei canali semicircolari contiene l'endolinfa e comunica a livello delle sue due estremità, con l'utricolo. Una delle estremità di ogni canale è dilatata (**ampolla**) e al suo interno contiene una struttura definita **cresta ampollare** dove sono presenti recettori sensitivi dell'equilibrio raggiunti da terminazioni del nervo vestibolare. Questi recettori ampollari insieme a quelli delle macule dell'utricolo e del sacculo entrano nella costituzione del **sistema vestibolare** che prende parte alla funzione dell'equilibrio (Fig. 19-14).

### Coclea

La **coclea** (o **chiocciola ossea**) è formata da un canale osseo a decorso spirale, posto anteriormente al sacculo e accolto nella rocca petrosa dell'osso temporale. Questo condotto si avvolge attorno ad una struttura ossea di forma conica, chiamata **modiolo** o **columella**; la parte membranosa detta **condotto cocleare** termina a fondo cieco a livello dell'apice della coclea; il condotto cocleare ha una sezione trasversa di forma pressoché triangolare. È collocato all'interno della coclea in maniera da suddividere il condotto osseo in tre parti o scale: la **scala superiore** *(vestibolare)* e quella **inferiore** *(timpanica)* contengono perilinfa mentre la **scala media** contiene endolinfa. All'apice del condotto cocleare, la scala vestibolare si continua con la scala timpanica, attraverso un piccolo foro chiamato **elicotrema**. I recettori sensitivi dell'udito sono localizzati in una struttura a decorso spirale contenuta nella coclea e chiamata **organo del Corti** (Fig. 19-14).

## SVILUPPO DELL'ORECCHIO

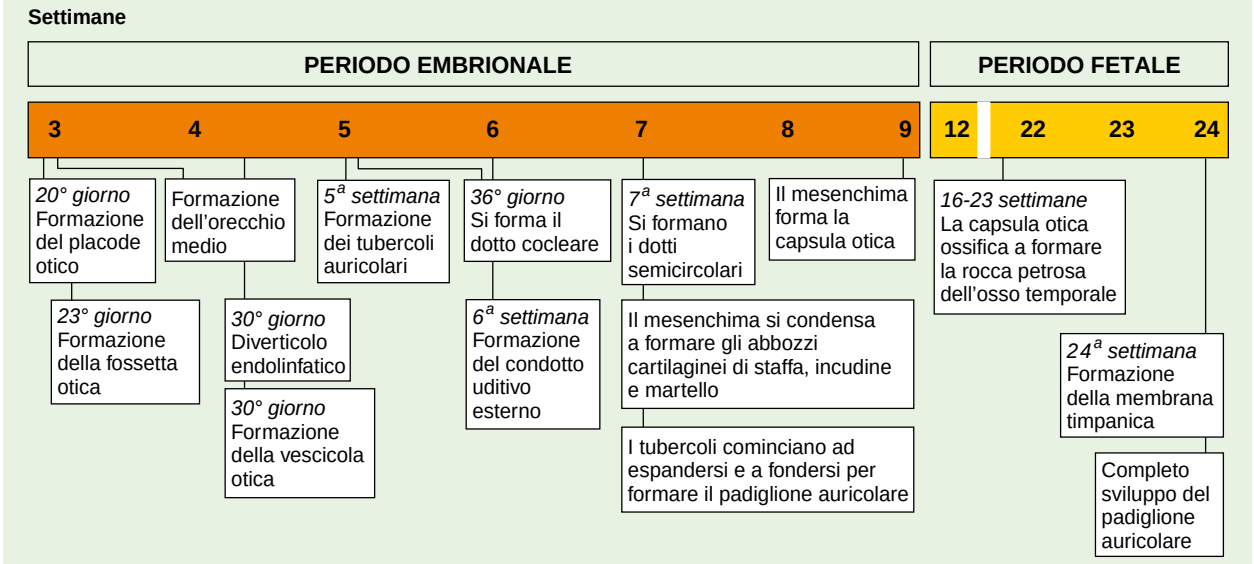
Tutti e tre i foglietti embrionali contribuiscono a costituire le componenti dell'orecchio (Fig. 19-15).

### Orecchio esterno

Il foglietto ectodermico della regione laterale della testa, in prossimità del **primo solco branchiale**, si spinge in profondità all'interno del mesoderma sottostante; inizialmente forma un cordone cellulare solido. Successivamente il cordone si cavita e si modella dando origine all'epitelio del condotto uditivo esterno; a livello della sua estremità cieca, forma il rivestimento epiteliale della superficie della membrana del timpano rivolta verso il condotto stesso.

Anche il mesoderma partecipa alla formazione dell'orecchio esterno. In una prima fase, verso il 40° giorno di sviluppo, le appendici posteriori del **primo**

## TABELLA CRONOLOGICA DELLO SVILUPPO TEMPORALE DELL'ORECCHIO



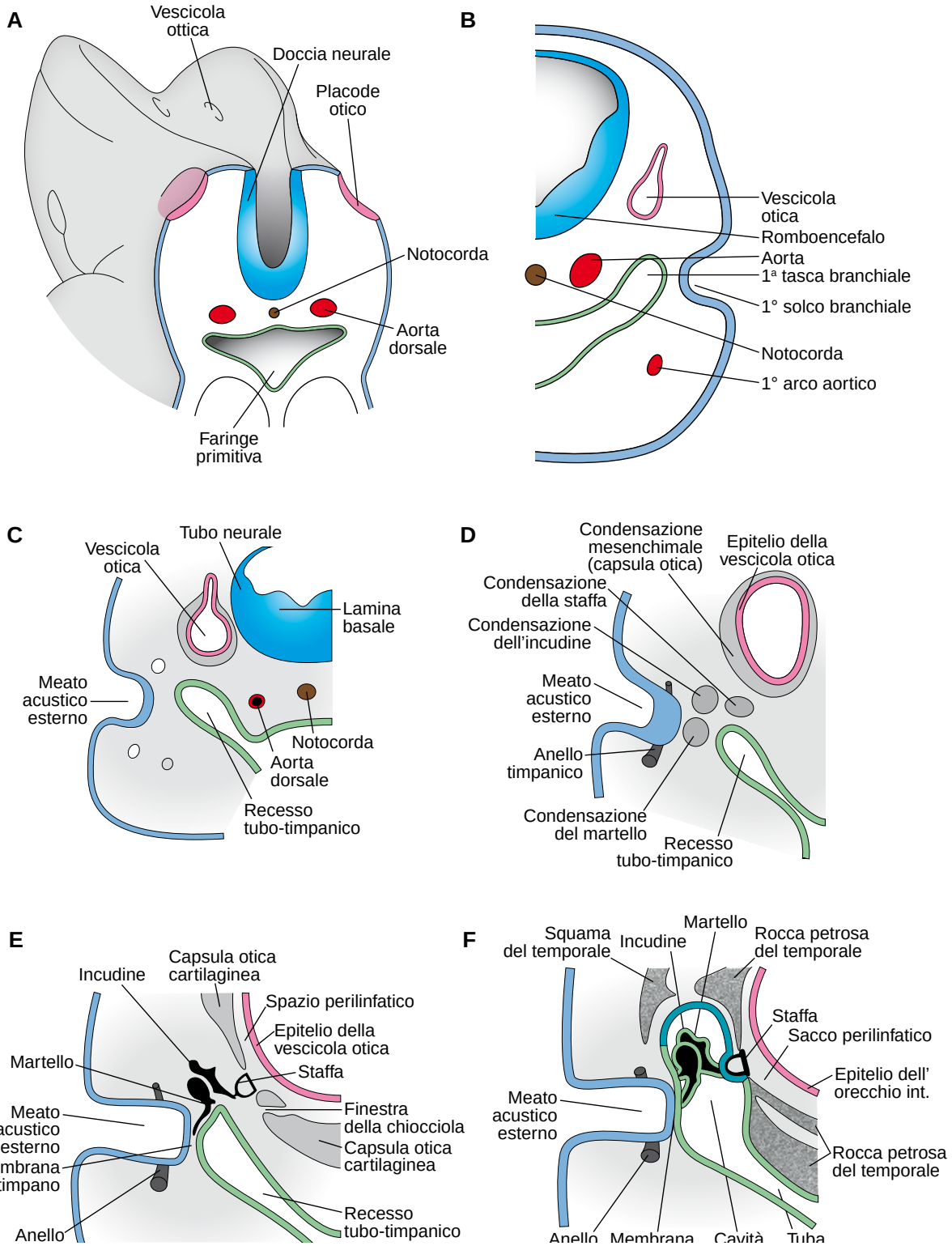



**Figura 19-15** ■ Prime fasi dello sviluppo dell'orecchio. *A)* Placode otico. *B)* Il placode otico si in vagina a formare la vescicola otica. Sono evidenti il 1° solco e la 1ª tasca branchiale. *C)* Il solco e la tasca danno origine rispettivamente al meato acustico esterno e al recesso tubo-timpanico. *D)* Dal mesenchima del 1° e 2° arco faringeo si formano addensamenti che daranno origine ai tre ossicini: staffa, incudine e martello. *E)* Gli ossicini dell'orecchio medio si sono formati, ma sono ancora immersi nel mesoderma. *F)* Durante il nono mese, la cavità timpanica si espande fino ad avvolgere i tre ossicini, e si forma la membrana del timpano. L'epitelio che riveste la cavità timpanica in prossimità della capsula otica e la porzione più distale della cavità si origina dalle cellule delle creste neurali e non dall'endoderma della 1ª tasca branchiale.

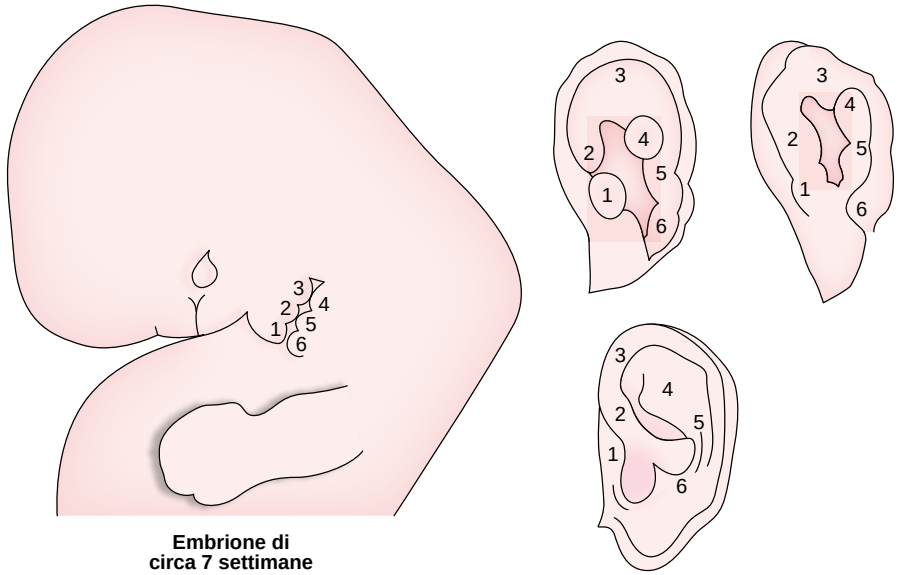



**Figura 19-16** ■ Formazione del padiglione auricolare da 6 tubercoli di origine mesenchimale che si sollevano sulla superficie esterna al primo e secondo arco branchiale in un embrione di circa 7 settimane. Sulla superficie esterna del capo è visibile il primo solco branchiale che sta formando il meato uditivo esterno. Il mesenchima del 1° e 2° arco prolifera e si evidenziano sulla superficie sei rilievi, i tubercoli auricolari. I sei tubercoli, in seguito, confluiscono e vanno a formare insieme all'ectoderma soprastante il padiglione auricolare definitivo.

**arco branchiale (mandibolare)** e del **secondo arco branchiale (ioideo)** circondano l'orifizio del condotto uditivo esterno: in posizione anteriore quella del primo arco e in posizione posteriore quella del secondo arco. Nel tessuto di queste appendici, ricoperto dall'ectoderma, avviene la proliferazione e il differenziamento del mesoderma in modo tale che si formano dei tubercoli di natura mesenchimale; la loro evoluzione darà luogo ad un processo di fusione e ampliamento che porterà alla costituzione del padiglione dell'orecchio intorno al 4° mese (Fig. 19-16).

## Orecchio medio

A livello della **prima tasca branchiale**, l'entoderma che riveste internamente l'**apparato faringeo** si estende verso l'esterno e dà origine all'epitelio della tromba d'Eustachio, della cassa del timpano e delle cavità mastoidee. L'estremità distale della prima tasca branchiale si dirige verso l'abbozzo del condotto uditivo che deriva dall'ectoderma del primo solco e, nella zona in cui formerà la cassa del timpano, viene in diretto rapporto con esso. Alla fine la membrana del timpano risulta formata dall'ectoderma derivato dal primo solco sul lato esterno, dall'entoderma derivato dalla prima tasca su quello interno e da un sottile strato di tessuto connettivale che si interpone tra loro derivato dal mesoderma. La cavità della cassa del timpano è rivestita da un epitelio con doppia origine embrionale. La regione ventrale, in prossimità della tuba uditiva, e le regioni laterali sono rivestite da epitelio pseudostratificato ciliato di origine endodermica, mentre la superficie in prossimità della capsula otica e la porzione più distale della cavità sono rivestite da un epitelio semplice non ciliato che si origina dalle cellule delle creste neurali (Figg. 19-13 e 19-15).

Nella stessa zona, intorno al 2° mese, il mesoderma derivato dagli **archi branchiali** (vedi Capitolo 14) contribuisce alla formazione degli ossicini; le estremità posteriori delle cartilagini dei primi due archi branchiali originano gli ossicini della cassa del timpano: in particolare il martello e l'incudine originano dalla **cartilagine di Meckel** del primo arco, la **cartilagine di Reichert**, del secondo arco, forma la staffa. Il progressivo allargamento delle pareti della cassa del timpano contribuisce al modellamento degli ossicini che si trovano al suo interno. Alla nascita la cavità del timpano riceve aria proveniente dalla tuba uditiva e da quel momento inizia la trasmissione delle vibrazioni causate dalle onde sonore all'orecchio interno (Fig. 19-15).

## Orecchio interno

Dopo l'inizio della quarta settimana dello sviluppo, l'ectoderma localizzato da entrambi i lati del **romboencefalo** diventa sede di un ispessimento localizzato definito **placode uditivo** o **otico**. Successivamente, ciascun placode si invagina nel tessuto connettivo sottostante e forma una sferetta cava isolata dal foglietto ectodermico da cui è originata, la **vescicola uditiva** (o **otocisti**) da cui deriva il **labirinto membranoso** (Fig. 19-15).

La forma iniziale della vescicola uditiva si complica sviluppandosi in modo diversificato; le modificazioni consistono in rigonfiamento, strozzatura e rotazione di

alcune porzioni della formazione sferica di partenza; alla fine si costituiscono parti distinte comunicanti tra loro: l'utricolo, il sacculo, i canali semicircolari, i canali e il sacco endolinfatico da una parte e il canale cocleare dall'altra (Fig. 19-17).

Il sacco endolinfatico compare intorno al 30° giorno come un'evaginazione che protrude in direzione dorsale; più tardi, dopo il quarto mese di gravidanza, si avvicinerà al mesenchima della dura madre per poi collegarsi ad essa e provvedere al riassorbimento del liquido endolinfatico.

Lo strozzamento della vescicola uditiva primaria dà origine all'utricolo, in posizione dorsale, e al sacculo, in posizione ventrale.

I canali semicircolari originano come evaginazioni dell'utricolo; all'inizio sono lamine appiattite e poi assumono la forma caratteristica tubulare ricurva con un'estremità dilatata, detta ampolla, all'interno della quale si differenziano le cellule specializzate dell'equilibrio (creste ampollari). Ancora più tardi i tre canali semicircolari assumono la disposizione angolare appropriata due verticali a 90° tra loro e uno orizzontale.

La coclea compare verso il 36° giorno sotto forma di un'evaginazione ventrale del sacculo; questa si allunga in una struttura lineare che poi si spiralizza su se stessa a causa di un accrescimento disomogeneo delle sue superfici. Prima del 3° mese di gravidanza la spirale cocleare è composta di due giri e mezzo ed ha assunto la sua configurazione definitiva. Il canale cocleare è rivestito da un epitelio cubico. Questo epitelio, differenziandosi, darà origine sia ad un epitelio sensoriale con cellule provviste di stereociglia (organo del Corti) che si collegheranno al ganglio acustico di Corti, sia a cellule più appiattite con funzione di sostegno (Fig. 19-18).

Il mesenchima che si trova attorno alle strutture derivate dalla vescicola uditiva evolve in tessuto cartilagineo e successivamente nel tessuto osseo che formerà la rocca petrosa dell'adulto. L'astuccio osseo contribuisce anche a determinare il modellamento del labirinto membranoso. Tra il 3° e il 5° mese di gravidanza, nello strato interno della capsula otica si formano un elevato numero di vacuoli riempiti da un liquido chiaro: la perilinfa. Questi spazi perilinfatici contenenti la perilinfa rimangono tra la componente ossea e la parte membranosa.

Dalla vescicola otica si originano anche le cellule che daranno origine al ganglio **cocleo-vestibolare** e ben presto si organizzano in rapporto con la componente vestibolare e con quella cocleare costituendo rispettivamente il **ganglio di Scarpa o vestibolare** e il **ganglio di Corti o acustico**. Le cellule contenute nei gangli differenziano in neuroni bipolari e i loro dendriti raggiungono gli epiteli sensoriali contenuti a livello dell'orecchio interno; gli assoni vanno invece a costituire le fibre nervose dei nervi encefalici rispettivi (VIII paio di nervi cranici): il **nervo vestibolare** e il **nervo cocleare** o **acustico** che raggiungeranno le aree del sistema nervoso centrale dove risiedono i sistemi di integrazione dell'equilibrio (**cervelletto**) e dell'udito (**corteccia temporale**) (Fig. 19-17).

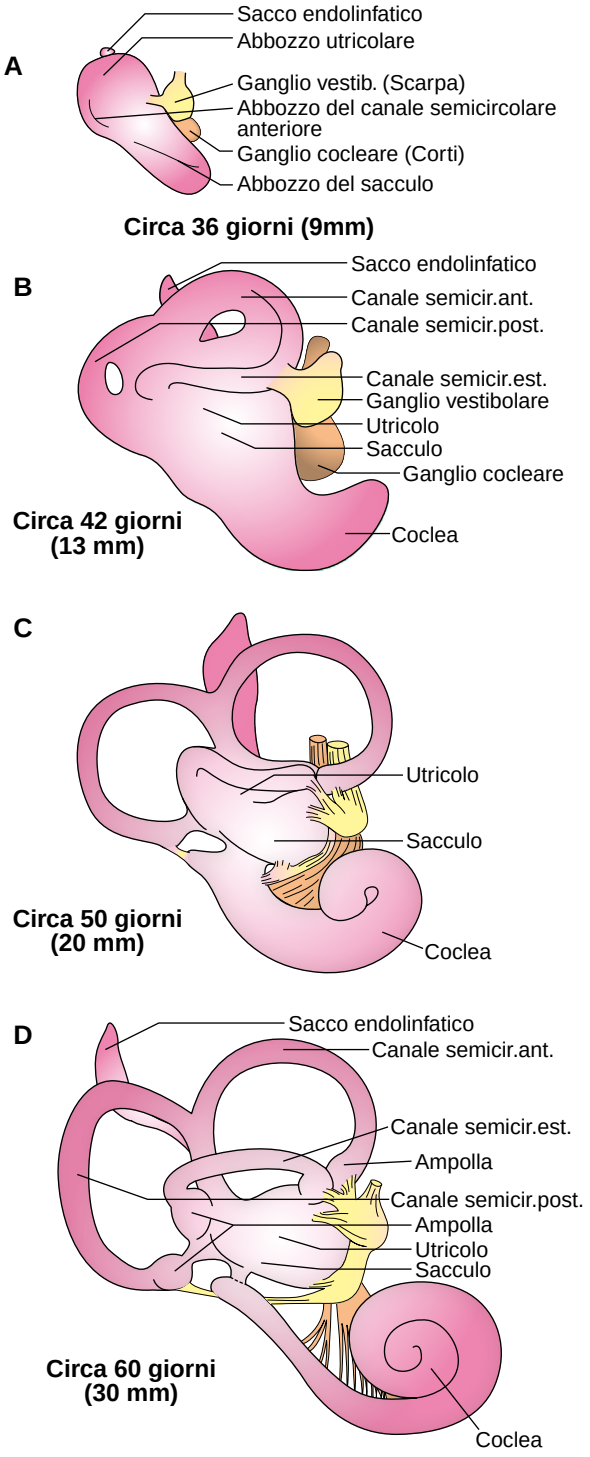



**Figura 19-17** ■ Sviluppo del labirinto membranoso umano. *A)* Durante la 5ª settimana, la vescicola otica si allunga e si strozza formando gli abbozzi dell'utricolo e del sacculo e del sacco endolinfatico. *B)* Durante la 6ª settimana a livello dell'utricolo inizia il differenziamento dei canali semicircolari che si completerà intorno all'8ª settimana. Nel frattempo, il sacculo emette un diverticolo che si allunga per formare il condotto cocleare. *C)* La coclea continua la sua crescita ed inizia la spiralizzazione, sono ben evidenti i canali semicircolari. *D)* Il labirinto membranoso assume un assetto quasi definitivo alla fine del secondo mese.

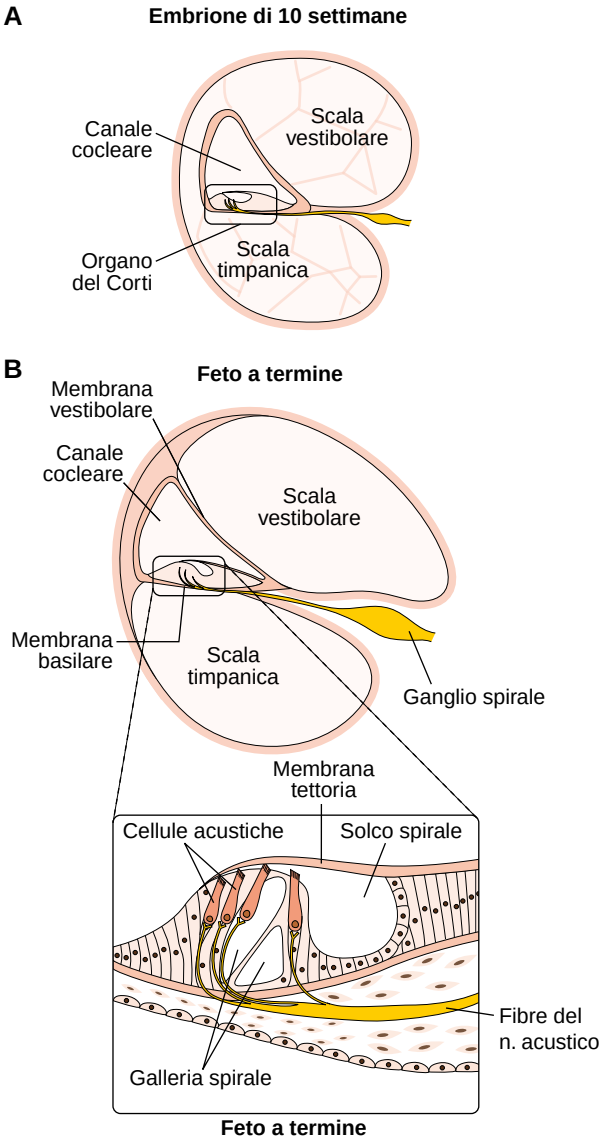



**Figura 19-18** ■ *A)* Sezione trasversale del canale cocleare in un embrione di 10 settimane. Il mesenchima che circonda il canale inizia a vacuolizzarsi per andare a formare due canali: uno superiore, la scala vestibolare, e uno inferiore, la scala timpanica. B) Sezione trasversale del canale cocleare in un feto a termine. La parete del canale cocleare a contatto con la scala vestibolare forma la membrana vestibolare, mentre la parete verso la scala timpanica appoggiata sulla membrana basilare, si ispessisce e dà origine all'organo del Corti. Nell'inserto, particolari della zona dell'organo del Corti con le cellule sensoriali (o acustiche) ciliate divise in cellule esterne, distribuite su tre file parallele, e cellule ciliate interne, distribuite su un'unica fila. Insieme alle cellule sensoriali si trovano le cellule di sostegno. Al di sopra di queste cellule si estende la membrana tettoria.

## PROCESSI E MOLECOLE

### *Differenziamento dell'orecchio interno*

Lo sviluppo dell'orecchio interno ha origine dal placode otico che si forma nella regione dei pre-placodi adiacente al confine tra i rombomeri 5 e 6 del romboencefalo (Fig. 19-9).

Come abbiamo già visto (Fig. 19-17), l'ectoderma del placode otico, invaginandosi, dà origine alla **vescicola otica** o otocisti da cui si sviluppano tutta la serie di strutture altamente complesse che costituiscono l'orecchio interno. Il primo passo è l'attivazione nella regione dell'ectoderma cefalico di quei geni, comuni alla regione dei pre-placodi, che rendono il tessuto capace di rispondere a segnali differenziativi provenienti dai tessuti circostanti. L'ectoderma comincia ad esprimere geni della famiglia ***Dlx*** e ***Eya*** e diventa capace di rispondere agli **FGF** provenienti dal romboencefalo e dal mesoderma sottostante; a questo segue l'attivazione dei geni della famiglia *Pax*. Inizialmente questa regione, che esprime **PAX2**, non dà origine al solo placode otico, ma anche a una parte dei placodi epibranchiali, per cui viene anche chiamata regione dei progenitori otici ed epibranchiali (regione **OEPD**).

Sotto l'influenza di fattori prodotti dai tessuti circostanti, nella porzione dorso-mediale, più vicina al tubo neurale, elevati livelli di **WNT** attivano componenti del segnale mediato da **Notch**, quali il ligando di Notch, **JAG1** (Jagged1). L'interazione tra Notch e il suo ligando aumenta ulteriormente la risposta a WNT, mentre inibisce la risposta agli FGF. Nella regione più lontana, quella ventro-laterale, il segnale di WNT è più debole; di conseguenza JAG1 non viene attivato e tale regione si differenzia dando origine ai placodi epibranchiali (Fig. 19-19). Si è così definito il **placode otico** che, con il successivo differenziamento, dà origine alle strutture dell'orecchio interno e ai placodi epibranchiali da cui si originano, insieme ai placodi epibranchiali più caudali, i neuroni sensitivi dei nervi facciale, glossofaringeo e vago.

La struttura dell'orecchio interno è una struttura molto complessa dotata di forte asimmetria. I gradienti di morfogeni provenienti dai tessuti circostanti determinano nell'otocisti lo sviluppo degli assi dorso-ventrale, antero-posteriore e medio-laterale.

#### *Asse dorso-ventrale*

La formazione dell'asse dorso-ventrale dipende da WNT secreto dalla parte dorsale del tubo neurale nella regione del futuro romboencefalo, e SHH prodotto dalla notocorda e dalla lamina basale del tubo neurale. Il segnale di WNT attiva nell'otocisti la **β-catenina** necessaria allo sviluppo della regione dorsale dove si origina il sistema vestibolare e i geni *Dlx5* e *Gbx2*. Nella porzione ventrale dell'otocisti SHH induce l'espressione dei geni necessari allo sviluppo della coclea quali *Pax2*, *Otx1* e *Otx2* (Fig. 19-20).

La vescicola otica si trova al confine tra i rombomeri 5 e 6 del romboencefalo e l'importanza dei segnali che provengono dai rombomeri adiacenti alla vescicola otica è sottolineata dal fatto che in topi con doppio knock out dei geni *Hoxa1* e *Hoxb1* si ha perdita della formazione del rombomero 5 e difetti nello sviluppo dell'orecchio interno. L'FGF indotto da *Hoxa1* e *Hoxb1* mantiene l'espressione di *Gbx2* e limita l'azione di WNT prevenendo una sua espansione in posizione ventrale.

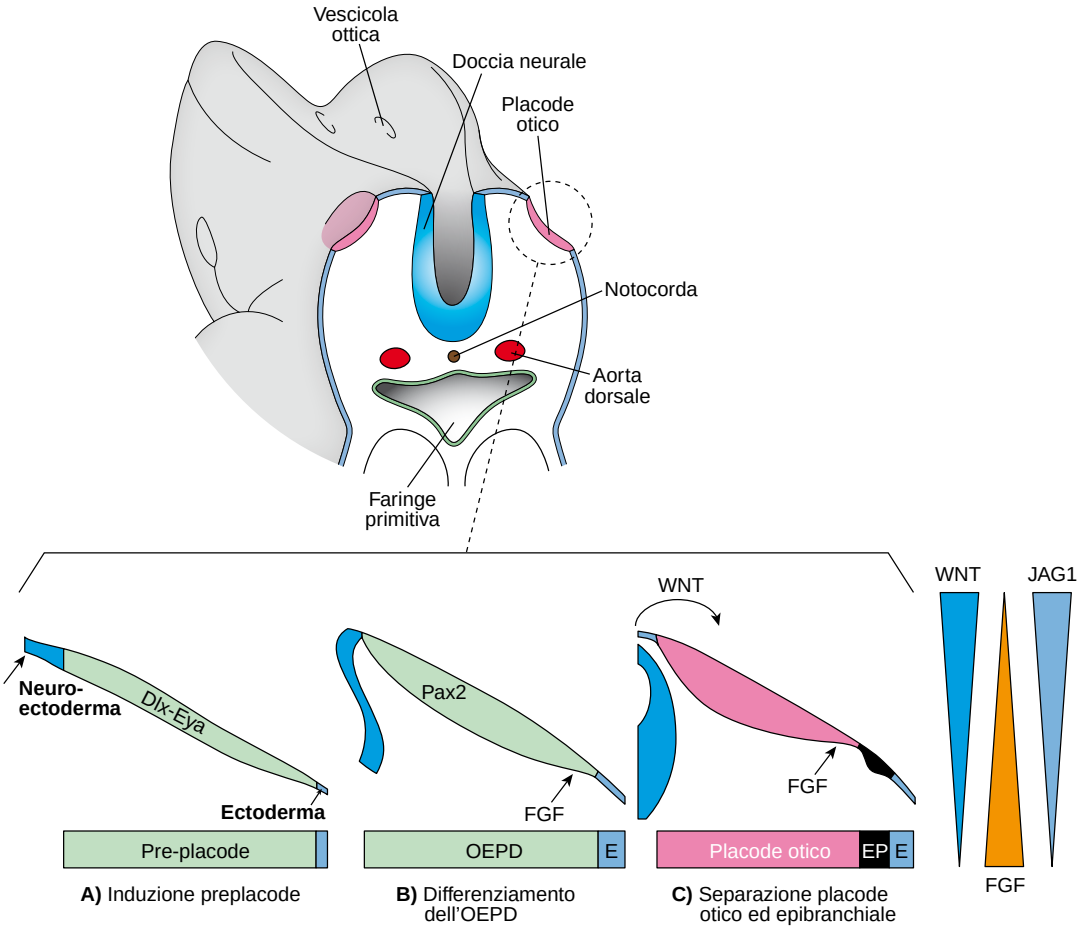



**FIGURA 19-19** ■ Differenziamento della regione comune dei pre-placodi nel topo. *A)* In questa regione comincia l'espressione dei geni *Dlx* ed *Eya*. *B)* L'FGF agisce su questa regione inducendo il differenziamento di un placode comune otico-epibranchiale che esprime PAX2. *C)* WNT secreto dal tubo neurale induce l'attivazione del segnale di Notch/JAG1 con conseguente inibizione della risposta ad FGF. Nella regione dorsale la risposta ad alti livelli di WNT dà origine al placode otico, mentre nella regione più ventro-laterale, dove i livelli bassi di JAG1 non inibiscono la risposta agli FGF, si differenzia il placode epibranchiale (nero).

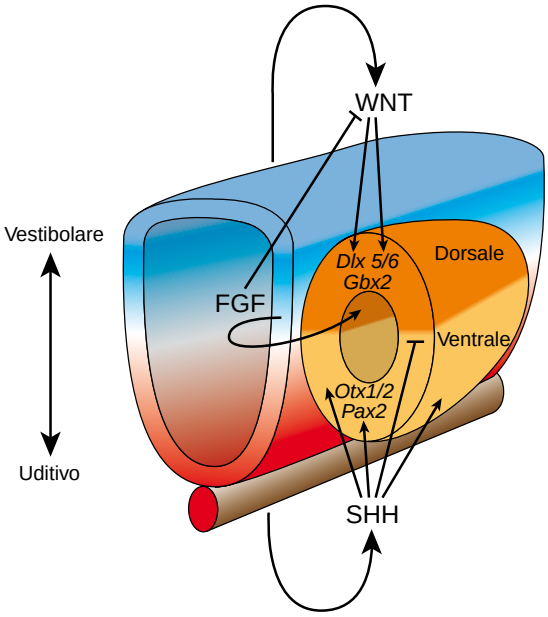



**FIGURA 19-20** ■ Modello della formazione dell'asse dorso ventrale nel topo. Il differenziamento della porzione vestibolare dorsale della vescicola otica con l'espressione di *Dlx5/6 e Gbx2*, dipende dall'azione di WNT proveniente dalla porzione dorsale del romboencefalo, mentre SHH, prodotto dalla notocorda e dalla porzione ventrale del romboencefalo, determinano il differenziamento in parte auditiva ventrale inducendo l'espressione di *Pax2, Otx1* e *2*. L'FGF prodotto a livello della porzione mediale dei rombomeri rinforza l'azione di WNT mantenendo l'espressione di *Gbx2* e nello stesso tempo blocca l'espansione ventrale di WNT.

La risposta a SHH è mediata da fattori di trascrizione "zinc finger" della famiglia GLI, espressi nell'epitelio della vescicola otica. **GLI3** può avere sia una funzione di repressore (**GLI3R**) che di attivatore (**GLI3A**) mentre **GLI2** ha funzione di attivatore **(GLI2A**). È stato dimostrato che l'azione di GLI3R è richiesta per l'induzione delle strutture dorsali dell'orecchio interno mentre gli attivatori GLI sono essenziali per le strutture ventrali. Un giusto equilibrio fra questi fattori è necessario per mediare l'induzione del gradiente di SHH. La formazione della porzione più ventrale del canale cocleare distale richiede alti livelli di GLI2/3A, la formazione del canale cocleare prossimale e del sacculo richiedono un segnale più debole di SHH mediato da un basso livello di GLI3R, mentre la regione vestibolare più dorsale dove c'è il livello più basso di SHH esprime più alti livelli di GLI3R. Quindi la formazione di gradienti di espressione di GLI3 R dalla parte dorsale e GLI2A/3A dalla parte più ventrale è responsabile della differente risposta a SHH (Fig. 19-21).

### *Asse antero-posteriore*

Le molecole che controllano l'asse antero-posteriore sono ancora poco conosciute. Nel pollo e nel topo, l'origine dell'induzione sembra derivare dall'epitelio soprastante, anziché dal romboencefalo come avviene per la Drosophila. Esperimenti eseguiti su embrioni di pollo hanno infatti mostrato come il differenziamento dell'orecchio interno non subiva alterazioni sia invertendo le rispettive posizioni dei due rombomeri 5 e 6 che ruotando di 180° la vescicola otica. Invece, se durante la rotazione della vescicola otica veniva incluso anche il soprastante ectoderma, si osservava un'inversione della polarità antero-posteriore dell'orecchio interno.

Uno dei primi eventi che si osserva durante lo sviluppo dell'orecchio interno si verifica a carico della porzione ventrale della vescicola otica, nella regione auditiva. Mentre la regione posteriore dà origine alla parte non sensitiva e ad un solo organo sensitivo, ovvero le cellule ciliate interne, la regione antero-ventrale dà origine alla parte sensitiva. Da questa regione alcune cellule dell'epitelio otico si separano dalla vescicola per delaminazione dando origine al **ganglio cocleo-vestibolare (CVG)**. Uno dei segnali che sembra avere una funzione nell'indurre la formazione di quest'asse antero-posteriore è l'**acido retinoico (RA**). Infatti, la produzione di RA in posizione più caudale da parte dei somiti, grazie alla presenza della **retinaldeide deidrogenasi di tipo 2 (RALDH2)**, un enzima della biosintesi dell'acido retinoico (vedi Fig. 10-15) e la degradazione dello stesso RA da parte dell'enzima CYP26C1 (cytochrome P450, famiglia 26, sottofamiglia c, polipeptide 1) prodotto dall'ectoderma in posizione più cefalica, crea, in questa regione, un gradiente di RA. Perturbando il segnale dato dal RA durante il periodo critico della formazione di quest'asse, si disturba il corretto sviluppo dell'orecchio interno (Fig. 19-22A).

In risposta a questo gradiente, nella regione posteriore dell'otocisti viene attivato il gene ***Tbx1*** che svolge un ruolo molto importante nel controllo della corretta espressione di geni lungo l'asse antero-posteriore. TBX1, promuovendo l'espressione di **BMP4 e OTX1**, è essenziale per la formazione del dotto cocleare e dei canali se-

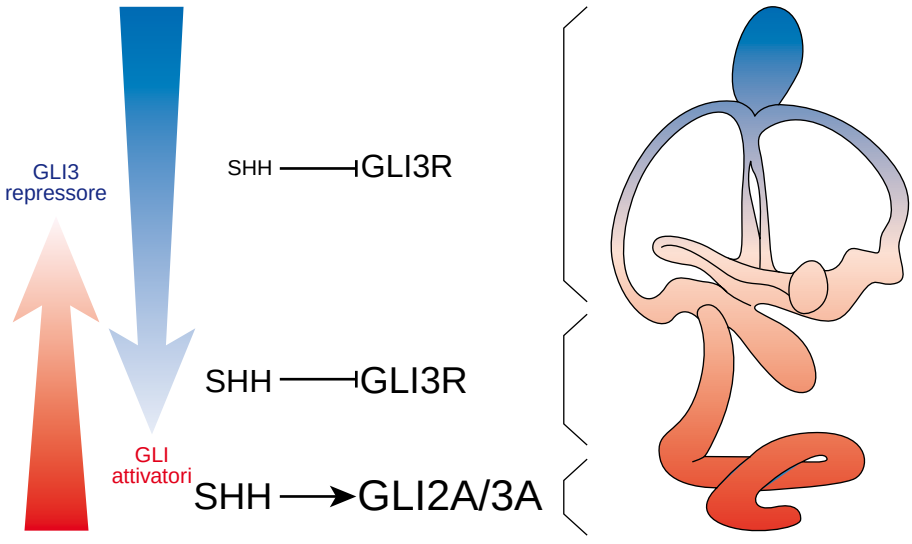



**Figura 19-21** ■ Differenziamento dorso ventrale del labirinto membranoso. Il gradiente di SHH prodotto dalla notocorda determina gradienti anche nell'espressione di molecole della famiglia GLI con attività di repressori o attivatori. La regione distale della coclea richiede per differenziarsi alti livelli di GLI 2/3 con funzione di attivatori, la porzione prossimale della coclea e il sacculo richiedono invece livelli più bassi di attivatori sufficienti ad inibire GLI3 con funzione di repressore, la regione più dorsale richiede invece per il differenziamento la presenza di GLI3 repressore che in questa regione non viene inibito dai livelli molto bassi di SHH.

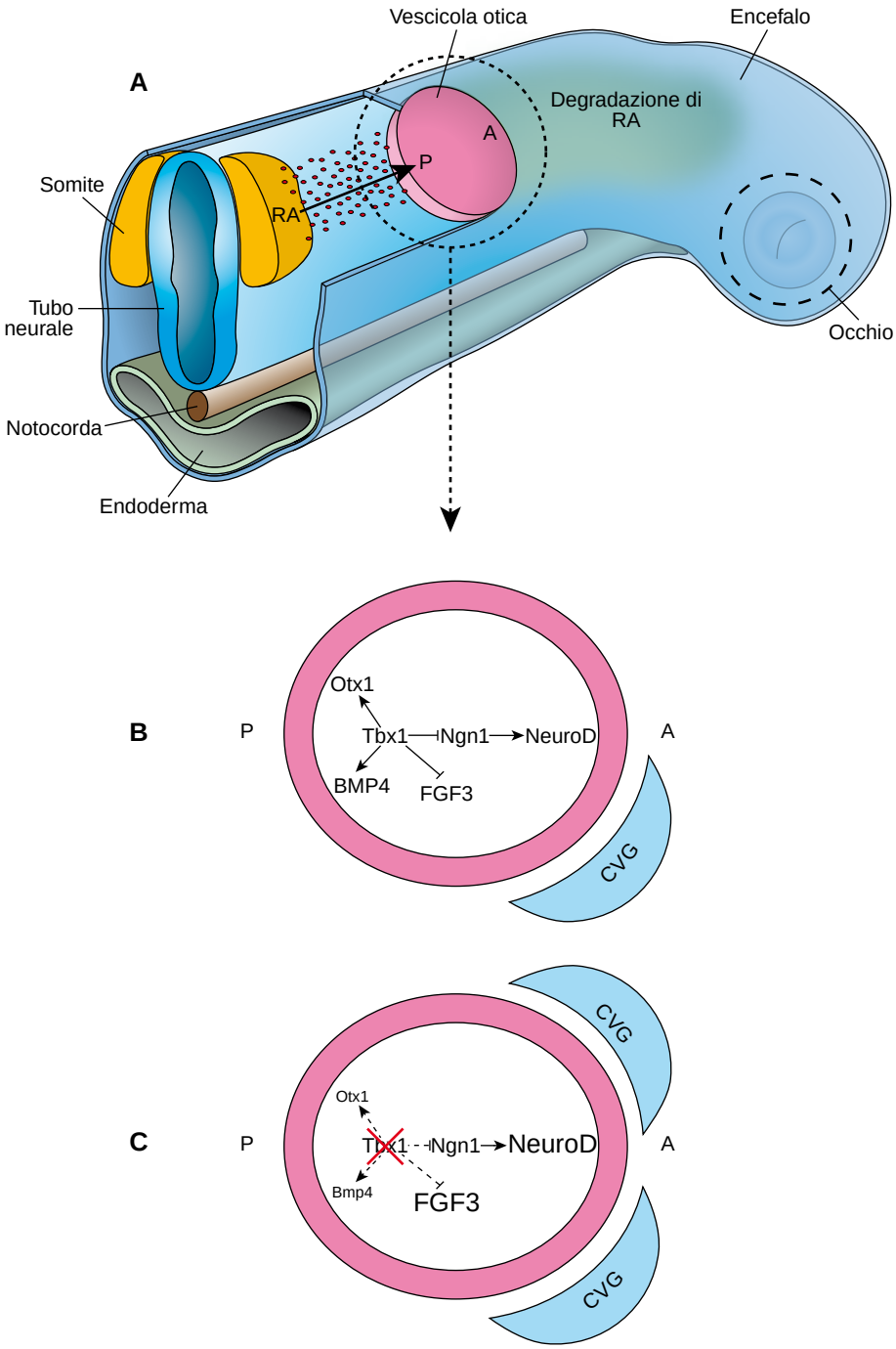



**Figura 19-22** ■ Definizione dell'asse antero-posteriore. A) Il differenziamento della vescicola otica lungo l'asse antero-posteriore è determinato da un gradiente di acido retinoico (RA). L'RA viene infatti prodotto a livello dei somiti grazie alla presenza di RALDH2 ma viene anche degradato in posizione più cefalica da parte dell'enzima CYP26C1 prodotto dall'ectoderma. B) L'acido retinoico induce, nella porzione posteriore della vescicola, *Tbx1* che a sua volta induce l'espressione di BMP4 e OTX1 e allo stesso tempo delimita l'espansione della zona anteriore inibendo Ngn1. Nella porzione anteriore Ngn1 inducendo neuroD promuove la neurogenesi e la formazione del ganglio cocleo-vestibolare (CVG). C) Inattivando *Tbx1* viene a mancare il controllo su NGN1 e si osserva un'aumentata neurogenesi con duplicazione del CVG.

micircolari nella regione posteriore ed ha anche il ruolo importante di delimitare, mediante inibizione dell'espressione di **Neurogenin 1 (NGN1)** e **NeuroD**, l'espandersi della zona anteriore dove si avrà invece neurogenesi. Il gene *Ngn1* è un membro della famiglia dei fattori di trascrizione **basic helix-loop-helix (bHLH)**; ha attività

neurogenica ed è espresso nelle cellule che danno origine sia ai neuroni sensitivi che alle cellule dell'epitelio sensoriale dell'orecchio interno. Topi in cui *Tbx1* viene inattivato nella vescicola otica presentano gravissimi difetti nello sviluppo dell'orecchio interno con una severa ipoplasia degli organi sensitivi e ad un'aumentata neurogenesi con duplicazione del CVG. In accordo con questi difetti morfologici si osservano, a livello, una diminuita espressione dei geni *Otx1* e *Bmp4* nella regione posteriore, e un'aumentata espressione dei geni *Fgf3* e *NeuroD* nel CVG (Fig. 19-22B,C).

## Sviluppo dell'epitelio sensoriale della coclea: organo del Corti

L'organo del Corti, situato all'interno della coclea, è formato da due tipi cellulari: le cellule di sostegno con funzione strutturale, e le cellule acustiche ciliate che funzionano da recettori e trasformano le vibrazioni sonore in impulsi elettrici grazie alle stereociglia presenti sulla loro superficie apicale. Entrambi i tipi cellulari si originano dall'epitelio della coclea. Le cellule ciliate sensoriali si dividono in cellule interne, distribuite su tre file parallele, e cellule ciliate esterne, distribuite su di un'unica fila (Fig. 19-18).

L'espressione di geni quali *Pax2* e ***Gata3*** è fondamentale per lo sviluppo della coclea e del sacculo, infatti, nel topo, la delezione di *Pax2* blocca la formazione del canale cocleare.

Alla formazione della coclea segue una fase di specificazione della regione che darà origine all'organo del Corti, in cui vengono espressi numerosi geni tra cui *Tbx1, Jag1/Notch, Sox2, Fgfr1*. A questo punto le cellule devono differenziarsi per dar luogo sia alle cellule sensoriali ciliate che alle cellule di supporto. Per lo sviluppo delle cellule ciliate sensoriali è necessaria l'espressione di un fattore di trascrizione della famiglia bHLH: **ATOH1** (Protein atonal homolog 1). ATOH1, inizialmente, è presente sia nei precursori delle cellule sensoriali che in quelli delle cellule di supporto, ma i suoi livelli non sono sufficienti ad indurre il differenziamento in cellule sensoriali. Entrambi i precursori esprimono anche fattori di trascrizione con attività inibitoria quali **ID-1, -2 e -3** (Inibitori del differenziamento e del legame al DNA). Le proteine ID sono fattori di trascrizione **HLH** (helix loop helix) in cui manca il dominio basico. Questi fattori, formano dimeri eterologhi con ATOH1 e ne bloccano l'azione impedendone il legame al DNA. Il successivo differenziamento in cellule sensoriali ciliate e cellule di sostegno avviene attraverso un meccanismo di inibizione laterale mediato dall'interazione tra Notch e i suoi ligandi JAG2 (Jagged2) e DLL1 (Delta-like1). Nelle cellule destinate a diventare cellule sensoriali l'espressione di ID-1, -2 e -3 diminuisce e, contemporaneamente, aumenta l'espressione di ATOH1. L'aumentata espressione di ATOH1 provoca il loro differenziamento in cellule sensoriali e induce l'espressione dei ligandi di Notch: JAG2 e DLL1. Queste due molecole attivano Notch, presente nelle cellule adiacenti destinate a diventare cellule di supporto, e inducono in queste cellule l'espressione di HES1 e HES5. Le proteine HES inibiscono a loro volta ATOH1. La diminuita espressione di ATOH1 insieme a segnali ancora non completamente identificati, provenienti dalle cellule sensoriali, induce il differenziamento di queste cellule in cellule di sostegno (Fig. 19-23).

Molti studi sullo sviluppo dell'orecchio sono stati fatti nel topo, che è un eccellente modello, in quanto lo sviluppo dell'orecchio interno nel topo presenta numerose analogie con quello dell'uomo. Difetti di espressione del gene *Tbx1* nell'uomo sono responsabili della **sindrome di Di George** o **velocardiofacciale**. In molti pazienti af-

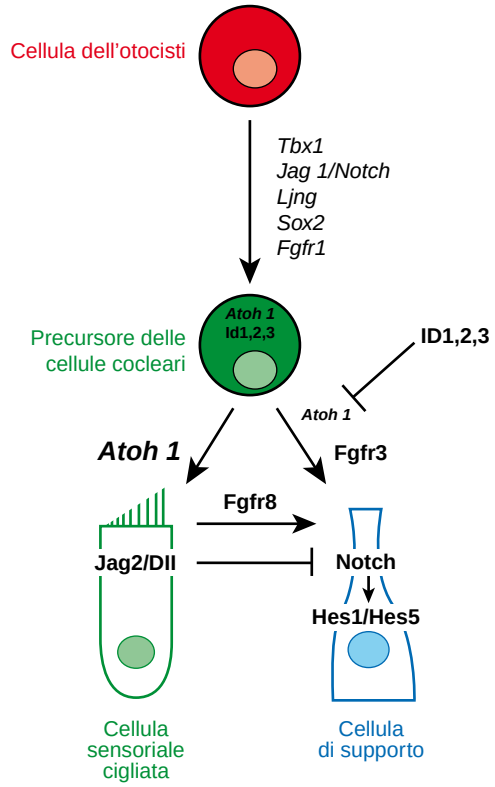



**Figura 19-23** ■ Le cellule della vescicola otica (o otocisti), destinate a differenziare in cellule sensoriali della coclea, cominciano ad esprimere geni quali *Tbx1, Jag1, Lfng, Fgfr1* e *Sox2*. In questa fase sia le cellule destinate a diventare cellule ciliate sensoriali che cellule di sostegno esprimono ATOH1, un fattore implicato nel differenziamento delle cellule sensoriali. L'attività di Atoh1 viene inizialmente controllata dall'azione inibitoria di ID1, 2 e 3, anche loro presenti in questi precursori. L'espressione delle ID cala nelle cellule destinate a diventare cellule sensoriali causando un aumento dell'attività di ATOH1 che, a sua volta induce l'espressione dei ligandi di Notch, JAG2 e DLL1. Il differenziamento delle cellule di supporto dipende da segnali di inibizione laterale mediati da Notch e i suoi ligandi. Nelle cellule adiacenti è infatti presente, sulla membrana, Notch. La sua interazione con JAG2 e DLL1, prodotti dalle cellule sensoriali, induce in queste cellule l'espressione di Hes1 e Hes5. Le proteine HES inibiscono a loro volta ATOH1. La diminuita espressione di ATOH1 insieme a segnali provenienti dalle cellule sensoriali induce il differenziamento di queste cellule in cellule di sostegno.

fetti da questa patologia si osserva perdita dell'udito e malformazioni dell'orecchio interno.

Nell'uomo sono presenti anche la sindrome *coloboma-renale* (RCS) con difetti genetici a carico di PAX2 e la sindrome ipoparatiroidismo-sordità-malattia *renale* (*HDR*) causata da insufficiente produzione del fattore di trascrizione "zinc finger" GATA3. Anche in questi casi, i componenti di tali famiglie presentano difetti nello sviluppo dell'orecchio interno.

## ASPETTI CLINICI

### *Malformazioni dell'orecchio*

#### *Sordità congenita*

Spesso si tratta di una forma ereditaria che si verifica in seguito a malformazione dell'orecchio interno. In alcuni casi sono presenti lesioni dell'organo del Corti, più raramente si ha una vera e propria **aplasia dell'orecchio**. I soggetti affetti da forma bilaterale non riescono a esprimere la parola (**mutismo**) a causa dell'impossibilità di imparare il linguaggio. La diagnosi di sordità congenita può essere posta alla nascita (alterata reazione ad una battuta di mani vicino al padiglione dell'orecchio).

#### *Aplasia completa*

In questa situazione si associano mancato sviluppo dell'orecchio interno, malformazioni di quello medio e di quello esterno. Il padiglione auricolare non è formato e al suo posto si trovano piccoli abbozzi di struttura cutaneo-cartilaginea posti a livello della superficie laterale della faccia. Il condotto uditivo esterno di solito è assente o è solamente abbozzato nella forma di un avvallamento della pelle. Sono inoltre presenti gravi alterazioni della cassa del timpano e del suo contenuto: gli ossicini mancano del tutto o sono gravemente malformati.

#### *Otospongiosi*

È una malformazione dell'orecchio medio a prevalente carattere familiare. Consiste nella formazione di zone anomale di ossificazione che ostacolano il movimento della catena degli ossicini. Si estrinseca in età adulta. Residui cartilaginei del primitivo abbozzo mesenchimale da cui si originano gli ossicini riprenderebbero la loro attività con conseguente formazione di zone anomale.

## Letture consigliate


Ashery-Padan R, Gruss P. Pax6 lights-up the way for eye development. Current Opinion in Cell Biology 13, 706-714, 2001.

Cvekl A, Tamm ER. Anterior eye development and ocular mesenchyme: new insights from mouse models and human diseases. Bioessays 26, 374-386, 2004.

Freyer L, Morrow BE. Canonical Wnt signaling modulates *Tbx1*, *Eya1* and *Six1* expression, restricting neurogenesis in the otic vesicle. Dev Dyn 239, 1708-1722, 2010.

Groves AK, Fekete DM. Shaping sound in space: the regulation of inner ear patterning. Development 139, 245-257, 2012.

Harada T, Harada C, Parada LF. Molecular regulation of visual system development: more than meets the eye. Genes Dev 21, 367-378, 2007.

Haruki HO, Reza HM, Yasuda K. Transcription factors involved in lens development from the preplacodal ectoderm. Developmental Biology 363, 333-347, 2012.

Streit A. The preplacodal region: an ectodermal domain with multipotential progenitors that contribute to sense organs and cranial sensory ganglia. Int J Dev Biol 51, 447-461, 2007.

Vrijens K, Van Laer L,·Van Camp G. Human hereditary hearing impairment: mouse models can help to solve the puzzle. Hum Genet 124, 325-348, 2008.

Whitfield TT, Hammond KL. Axial patterning in the developing vertebrate inner ear. Int J Dev Biol 51, 507-520, 2007.

# La placenta

Rita Canipari

## STRUTTURA

La **placenta** è un organo complesso che permette prima all'embrione e poi al feto di nutrirsi, respirare, eliminare le sostanze di rifiuto e difendersi da sostanze nocive e agenti patogeni (batteri e virus) cui può essere esposto durante la vita in utero. Questo organo svolge importanti funzioni anche per la madre, fornendole gli ormoni necessari per il regolare proseguimento della gravidanza. La placenta è formata da due componenti: una porzione embrio-fetale derivante dal **corion frondosum** e una materna derivante dalla **decidua basale** (Fig. 20-1). La placenta umana per la sua forma circolare viene classificata come discoidale. La parte materna è formata dalla decidua basale e presenta 10-30 rigonfiamenti definiti **cotiledoni materni**. Sul versante embrio-fetale la placenta è limitata da una lamina connettivale che prende il nome di **placca corionica** e contiene il punto di attacco del cordone ombelicale da cui si distribuiscono all'intero disco placentare le arterie e le vene ombelicali. La superficie embrio-fetale della placenta e il cordone ombelicale sono rivestiti dall'amnios che da loro un aspetto liscio (Fig. 20-2). Tra la decidua basale e la placca corionica si trovano gli spazi intervillosi, ripieni di sangue materno.

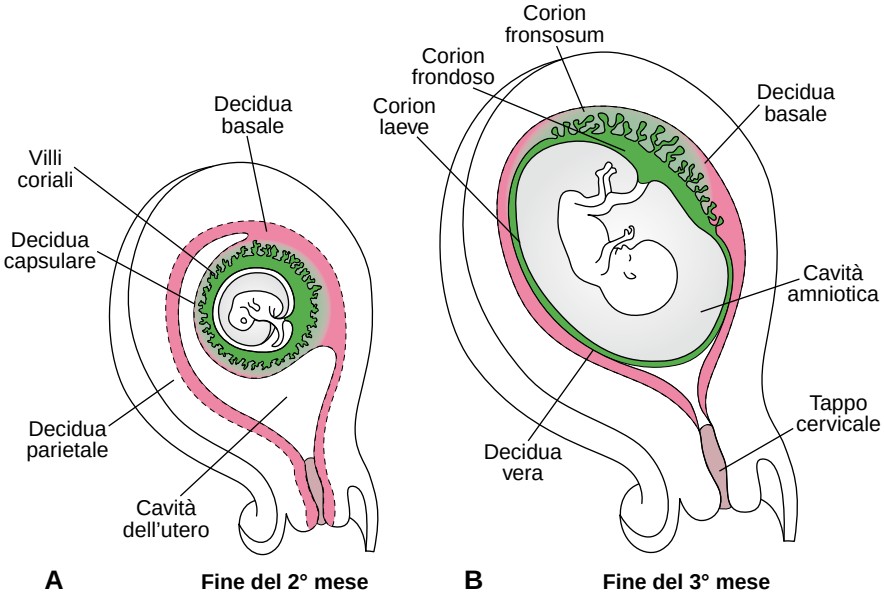



**Figura 20-1** Disegno schematico che rappresenta la relazione tra le membrane fetali e la parete uterina in embrioni di 2 e 3 mesi. Nella placenta primitiva *(A)* il corion presenta villi per tutta l'estensione della superficie esterna. In seguito all'espansione dell'amnios si osserva la scomparsa della cavità uterina, la fusione della decidua capsulare con la decidua parietale e quindi la formazione della decidua vera. Nella placenta definitiva *(B)* si nota che i villi coriali rimangono solo dove il corion è in contatto con la decidua basale.

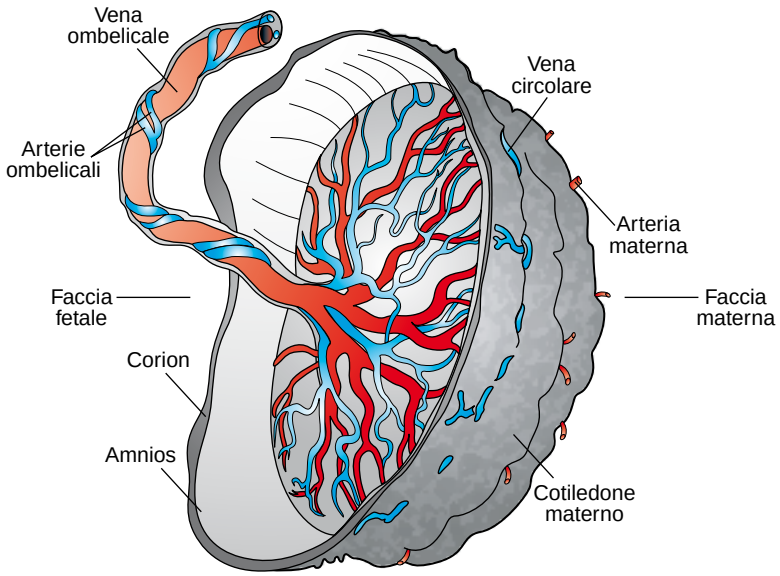



**Figura 20-2** ■ Disegno schematico di placenta a termine. Sono visibili sulla faccia materna i rilievi dei cotiledoni materni e sulla faccia fetale i rilievi dei vasi ombelicali. Nel cordone ombelicale si vedono in blu le due arterie ombelicali e in rosso la vena ombelicale.

Il sangue materno, come vedremo in seguito, è separato dal sangue embrio-fetale solo da un tessuto derivante dal corion, per cui la placenta umana è considerata di tipo **emocoriale**.

Durante lo sviluppo, la placenta presenta due tipi di organizzazione: **placenta primitiva** con villi presenti su tutta la superficie del corion e **placenta definitiva** di forma discoidale con villi presenti solo nella porzione embrionale del corion.

## LA PLACENTA PRIMITIVA

Nel Capitolo 10 abbiamo visto che già alla fine della 2ª settimana si è formata una rudimentale placenta formata dai villi secondari del corion e dalle lacune sanguigne. Da ricordare che nella placenta primitiva i villi sono presenti su tutta l'estensione della superficie esterna del corion (corion diffuso) (Fig. 20-1A).

La superficie dei villi secondari è formata dal **sinciziotrofoblasto**, disposto su uno strato di cellule **citotrofoblastiche** che, a loro volta, rivestono un'asse di **mesoderma extraembrionale**. Durante la 3ª settimana nel mesoderma dei villi si sviluppano vasi per cui i villi vengono ora definiti **villi terziari**.

Verso la fine della 3ª settimana le cellule del citotrofoblasto, continuando a proliferare, perforano lo strato sinciziale apicale e si addentrano nel tessuto deciduale andando a formare uno strato di rivestimento esterno chiamato **guscio citotrofoblastico**, che ancora saldamente il corion alla mucosa uterina (endometrio). I villi che connettono il guscio citotrofoblastico con il disco corionico vengono chiamati **villi ancoranti**. Dai villi ancoranti si ramificano lateralmente dei **villi fluttuanti**, che formano una struttura simile a quella di un albero e si proiettano nelle circostanti lacune sanguigne, cosicché la superficie di scambio tra embrione e sangue materno ne risulta notevolmente amplificata. Durante la 4ª settimana il sistema dei vasi dei villi si collega a quello dell'embrione (Fig. 20-3).

Le ramificazioni laterali dei villi perdono progressivamente lo strato citotrofoblastico mentre i capillari si dilatano e si ha un progressivo assottigliamento del connettivo che li circonda e del sinciziotrofoblasto. Queste modificazioni fanno sì che l'endotelio dei capillari aderisca allo strato sinciziale, sicché la barriera che separa il sangue materno da quello fetale si assottiglia fino a uno spessore di poco più di 2 µm (simile a quello della barriera di diffusione aria-sangue nei polmoni), favorendo gli scambi metabolici tra sangue materno e fetale (Fig. 20-4).

Dalle cellule del guscio citotrofoblastico si differenziano cellule che possono fondersi a formare dei sincizi (**cellule giganti**) altamente invasivi. Le cellule giganti che invadono la decidua e parte del miometrio sono dette **interstiziali** mentre quelle che invadono le arterie spirali uterine sono dette **endovascolari** (Fig. 20-5).

La proliferazione e la capacità invasiva delle cellule del citotrofoblasto dipende in parte dalla percentuale di ossigeno nei tessuti. Le cellule del citotrofoblasto umano infatti proliferano in condizioni di ipossia tipiche della placenta all'inizio della gestazione (2% $O_2$) dovuto al limitato flusso sanguigno negli spazi intervillosi, e non formano sincizi. Al contrario diventano invasive in condizioni di buona ossigenazione quando verso la 10ª-12ª settimana il flusso sanguigno negli spazi intervillosi aumenta. In presenza di alte concentrazioni di ossigeno (20% $O_2$) le cellule del citotrofoblasto smettono di proliferare e si fondono a formare sincizi invadendo la matrice extracellulare.

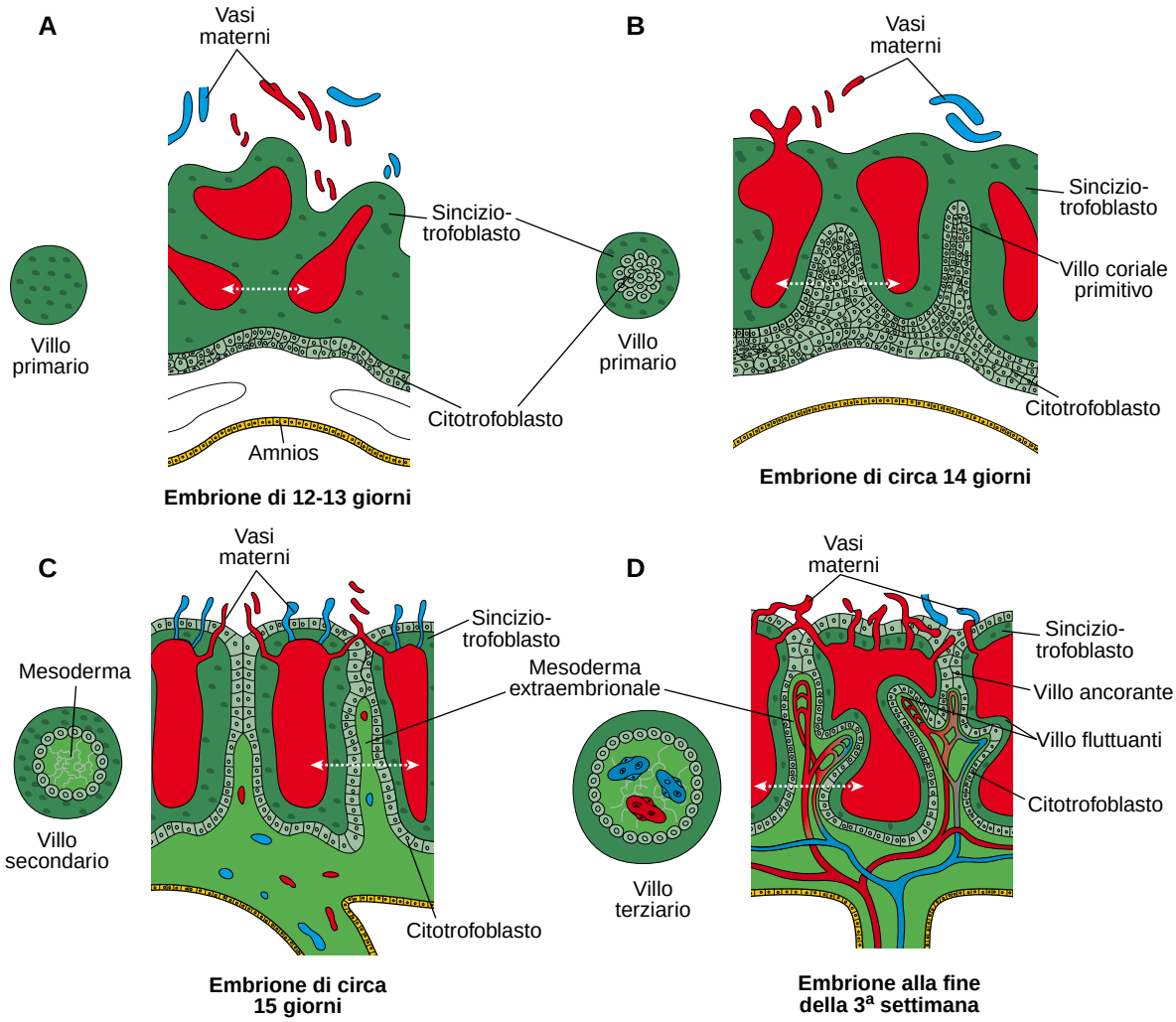



**FIGURA 20-3** ■ Disegno schematico che mostra l'evoluzione del trofoblasto e la formazione dei villi placentari. *A)* Nell'embrione di 12-13 giorni appaiono nel sinciziotrofoblasto delle lacune dove defluisce il sangue materno. Nella sezione del villo si trova esclusivamente sinciziotrofoblasto. *B)* Intorno al 14° giorno il citotrofoblasto si espande nel sinciziotrofoblasto dando origine ai villi primari. Nella sezione di un villo primario è visibile l'asse di citotrofoblasto. *C)* L'asse citotrofoblastico del villo primario viene invaso dal mesoderma extraembrionale dove si formano le prime isole sanguigne. Si parla adesso di villi secondari. *D)* Alla fine della terza settimana nell'asse mesenchimale dei villi le isole sanguigne confluiscono a formare vasi sanguigni. Questi vasi si connettono ai vasi ombelicali e danno origine alla circolazione feto-placentare: si sono formati i villi terziari.

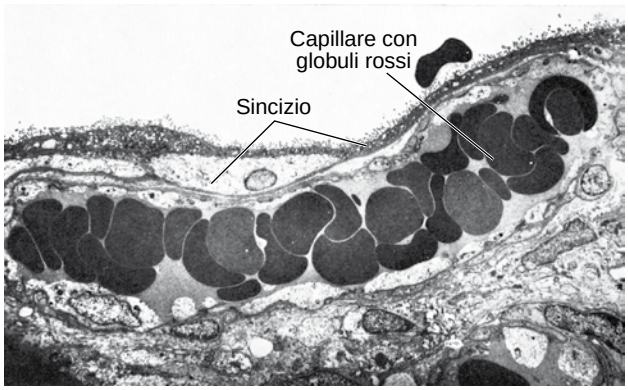



**FIGURA 20-4** ■ Microfotografia elettronica della porzione di un villo terminale, appartenente ad un feto a termine. Si noti l'orlo a spazzola (microvilli) ininterrotto delle cellule del sincizio e la vicinanza del capillare fetale alla superficie del villo (×4.200). (*Da* W.J. Hamilton, J.D. Boyd, H.W. Mossman, Embriologia umana, Piccin Nuova Libraria, Padova, 1977.)

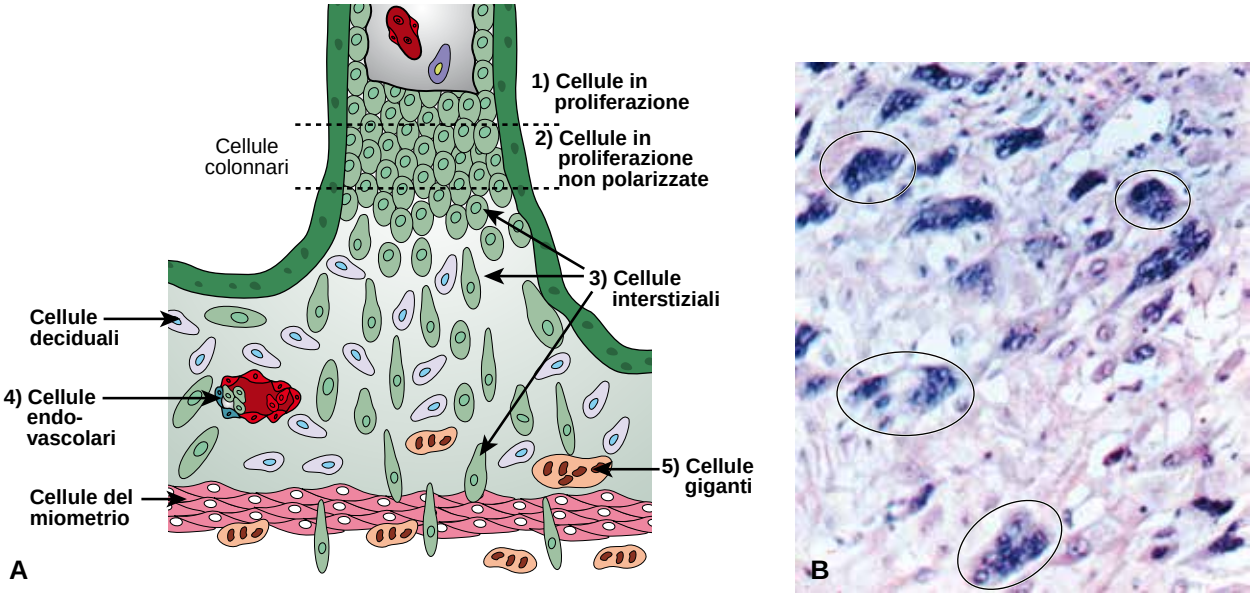



**Figura 20-5** ■ *A)* I differenti sottotipi di cellule citotrofoblastiche presenti in un villo: 1) cellule epiteliali polarizzate proliferanti, adese alla lamina basale; 2) cellule non polarizzate in attiva proliferazione con scarsa sostanza extracellulare; 3) grandi cellule poligonali non proliferanti immerse in abbondante matrice extracellulare (queste cellule diventano altamente invasive, sono abbondanti nella prima parte della gravidanza e decrescono con il progredire di essa); 4) le cellule endovascolari sono cellule interstiziali che hanno invaso i capillari materni; 5) le cellule giganti multinucleate sono sincizi non proliferanti presenti nella profondità della decidua vicino al miometrio. *B)* Microfotografia che mostra cellule polinucleate giganti nell'utero gravido umano di 20 settimane (cellule in blu scuro evidenziate con un cerchio) (*da* J. Obst. Gyn. Brit. Emp.).

## LA PLACENTA DEFINITIVA

Durante il terzo mese, come conseguenza dell'espansione del corion e dell'amnios, i villi situati dalla parte della **decidua capsulare** vengono stirati fino a scomparire. Dalla parte opposta, in corrispondenza della **decidua basale**, i villi diventano più folti, lunghi e ramificati per compensare la scomparsa dei villi dal lato deciduale. Si contano da 20 a 40 tronchi villosi che dividono il corion in altrettante aree chiamate **cotiledoni fetali**. La zona in cui sono presenti i villi nel polo embrionale prenderà il nome di ***corion frondosum*** mentre la restante parte diventata perfettamente liscia si chiamerà ***corion laeve***.

Con l'avanzare della gravidanza, la **decidua parietale** e quella capsulare sul versante opposto dell'utero vengono ad accollarsi e fondersi in un unico strato (**decidua vera**) obliterando la cavità uterina. La decidua basale insieme al corion frondosum andrà a costituire la placenta definitiva il cui aspetto discoidale è determinato dalla forma dell'area di persistenza dei villi coriali (Fig. 20-1).

Durante il 4°-5° mese, dalla placca deciduale si formano dei setti connettivali che si spingono negli spazi intervillosi senza raggiungere la placca corionica. Questi setti dividono la decidua basale in 10-30 zone chiamate **lobi** o **cotiledoni materni**. Dal momento che questi setti non raggiungono la placca corionica, gli spazi intervillosi dei vari cotiledoni rimangono in comunicazione. Da notare che i cotiledoni materni non corrispondono esattamente ai cotiledoni embrionali. Mentre i primi sono una porzione di placenta compresa tra due setti, i secondi sono ciascun tronco villoso fornito di vasi. Un cotiledone materno può così contenere più di un cotiledone fetale, fino a quattro (Fig. 20-6).

L'intera superficie delle arborizzazioni dei villi ha una superficie superiore ai 9,3 $m^2$. Con la crescita del feto e l'aumento di volume dell'utero si osserva un progressivo accrescimento della placenta che durante la gravidanza va a coprire il 25-30% della superficie interna dell'utero.

Alla fine della gravidanza la placenta ha un diametro di circa 15-20 cm, uno spessore di circa 3 cm, e un peso che si aggira sui 500-600 grammi.

## REAZIONE DECIDUALE

Nella zona della mucosa uterina che viene a contatto con il sinciziotrofoblasto si osservano una serie di modificazioni morfologiche e funzionali note come **reazione deciduale**. Le cellule connettivali della mucosa uterina si rigonfiano, si caricano di glicogeno, proteine, lipidi, sostanze di riserva. Tali cambiamenti hanno lo scopo di favorire la sopravvivenza dell'embrione e soprattutto di contenere l'invasione del tessuto trofoblastico. La parete dell'utero è indotta a subire questi cambiamenti dall'azione delle cellule polinucleate giganti del trofoblasto. Queste cellule hanno diverse funzioni. All'inizio mediano il contatto, l'impianto e l'invasione nella parete dell'utero. Più tardi producono una serie di citochine e ormoni che regolano il sistema immunitario, l'ovaio, il metabolismo e la produzione di cellule del sangue nella

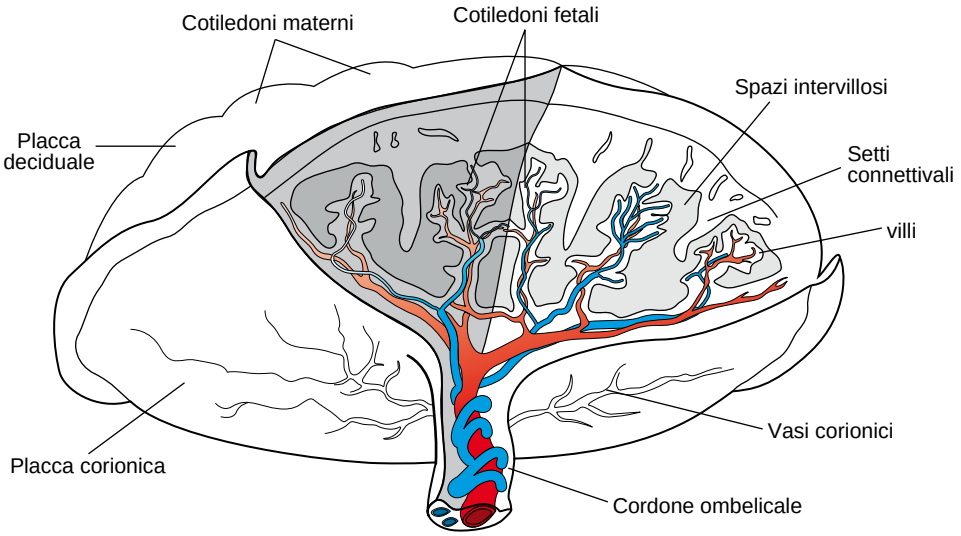



**Figura 20-6** ■ Spaccato di placenta umana a termine. Sono visibili sulla superficie materna i rilievi dei cotiledoni materni e sulla superficie fetale i rilievi dei vasi corionici. All'interno sono visibili i setti connettivali che delimitano gli spazi intervillosi interni in cui sono presenti uno o più cotiledoni fetali.

madre in modo da favorire la sopravvivenza dell'embrione e la crescita del feto.

Col progredire della gravidanza, la reazione deciduale si diffonde all'intera parete dell'utero. Le varie zone interessate dalla reazione deciduale prenderanno un nome diverso.

- La **decidua basale** indica quella porzione di mucosa uterina che subisce la reazione deciduale e che si trova laddove è avvenuto inizialmente l'impianto. La decidua basale andrà a costituire la parte materna della placenta.
- La **decidua capsulare** è la restante parte che circonda il prodotto del concepimento. Inizialmente è uno strato molto sottile di tessuto. Nel corso della gravidanza cresce e sporgerà nella cavità uterina.
- La **decidua parietale** è il resto della parete uterina che subisce, con l'andare del tempo, intensa reazione deciduale.

Al momento del parto le decidue vengono espulse, da cui il nome di decidue, insieme alla placenta (deciduus, *lat.* = che cade). Rimane solo lo strato connettivale più profondo dell'endometrio e la regione basale delle ghiandole endometriali.

## L'ALLANTOIDE E IL SACCO VITELLINO

Lo sviluppo iniziale dell'allantoide, che si è formato come diverticolo dell'endoderma della porzione caudale dell'intestino primitivo, caudalmente alla membrana cloacale, è già stato descritto nel Capitolo 15. L'allantoide si presenta come un'estroflessione dell'endoderma che si trasforma poi in diverticolo, che viene compreso nel peduncolo di connessione (Fig. 20-7). Sulla parete dell'allantoide è presente un ricco plesso vascolare, i **vasi allantoidei** (o **vasi allanto-coriali**) i quali, provenienti dall'aorta dorsale, raggiungono poi il corion e vi si ramificano.

Il sacco vitellino e l'allantoide sono strutture vestigiali che non hanno funzioni nell'embrione umano (ad eccezione della porzione prossimale dell'allantoide, che contribuisce alla formazione della vescica), tuttavia la loro presenza è essenziale per il normale sviluppo embrionale. Nel mesoderma che riveste il sacco vitellino, all'inizio della 3ª settimana, inizia la prima emopoiesi (vedi Capitolo 13). Inoltre nella parete del sacco vitellino verso la fine della 3ª settimana si possono identificare le cellule germinali primordiali (vedi Capitolo 12). Quindi, la circolazione tra l'embrione e il corion è assicurata in una prima fase dai vasi che circondano il sacco vitellino e il suo dotto. Successivamente, la ricca rete capillare che circonda l'allantoide prende il sopravvento. I vasi formatisi nell'allantoide andranno a formare le **vene e** le **arterie ombelicali**. La porzione intraembrionale dell'allantoide, che va dalla vescica urinaria all'ombelico, diventerà un tubo spesso, l'**uraco**. Dopo la nascita l'uraco diviene un cordone fibroso detto **legamento ombelicale mediano**.

## IL CORDONE OMBELICALE

Al termine dello sviluppo il **cordone ombelicale** è un funicolo lungo circa 50-60 cm, del diametro di circa 2 cm, che collega l'embrione e la madre. Alla fine della 2ª settimana, l'embrione è sospeso nella cavità corionica dal **peduncolo di connessione**, in cui va ad inserirsi l'allantoide. Alla fine della 3ª settimana allorché nel peduncolo di connessione si formano vasi sanguigni, esso viene definito **peduncolo ombelicale** (Fig. 20-7). Successivamente, con l'espansione dell'amnios e i ripiegamenti dell'em-

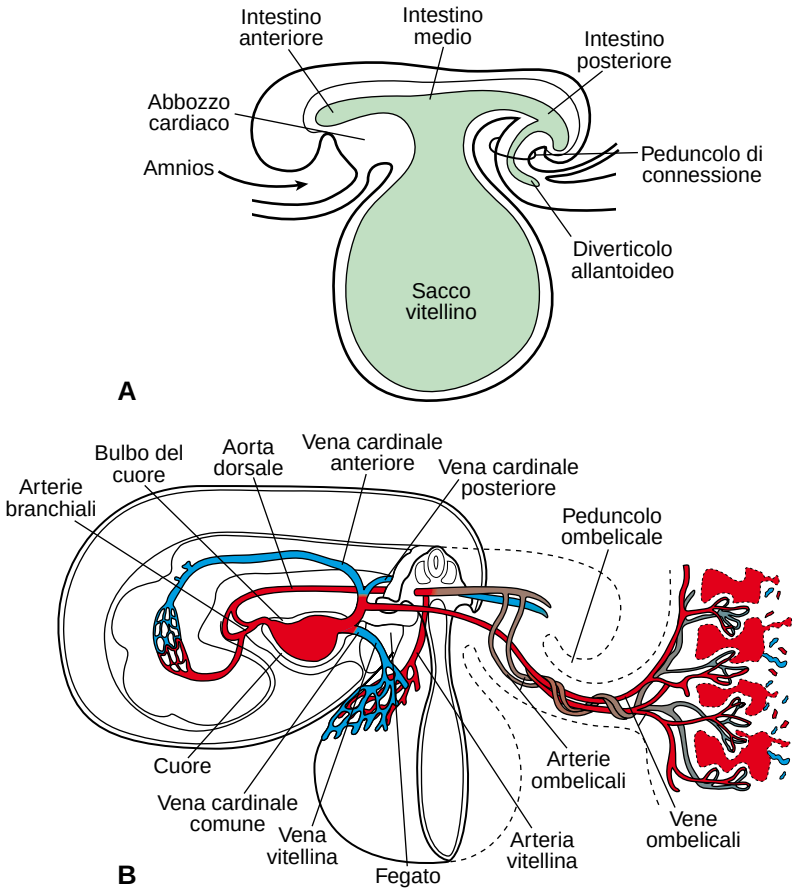



**Figura 20-7** ■ *A)* Immagine schematica che mostra come lo sviluppo del sacco amniotico determina la formazione del cordone ombelicale primitivo. Nella porzione più caudale dell'endoderma si osserva la formazione del diverticolo allantoideo che si inserisce nel peduncolo di connessione. *B)* Immagine schematica che mostra il primo abbozzo dell'apparato cardiocircolatorio e i rapporti tra circolo embrionale ed extraembrionale in un embrione di circa 1 mese. Nell'immagine si notano le vene e le arterie vitelline che si sono formate nel mesoderma splancnico della parete del sacco vitellino e le vene e le arterie ombelicali che si sono formate nella parete dell'allantoide.

brione si ha un progressivo avvicinamento del dotto vitellino e del peduncolo ombelicale, con i rispettivi vasi, allo stretto canale che collega le cavità celomatiche intra- ed extra-embrionali. Dall'insieme di queste strutture origina il **cordone ombelicale primitivo**, rivestito dalla membrana amniotica. La linea di giunzione di forma ovale tra l'amnios e l'ectoderma è chiamata **anello ombelicale primitivo**. In questo periodo la cavità addominale non è ancora sufficientemente espansa per contenere le anse intestinali che si stanno allungando rapidamente. Alcune anse intestinali fuoriescono momentaneamente nello spazio celomatico extraembrionale del cordone ombelicale andando a formare un'**ernia fisiologica**. Verso la fine del terzo mese le anse ritorneranno all'interno della cavità addominale e la cavità celomatica si oblitererà. Nel successivo periodo, quando l'allantoide, il dotto vitellino e i vasi vitellini si obliterano, il cordone è definito **cordone ombelicale definitivo** (Fig. 20-8).

A sviluppo definitivo, come detto sopra, le sue dimensioni raggiungono i 50-60 cm di lunghezza. Un cordone troppo lungo può attorcigliarsi intorno al collo del feto creando problemi al momento del parto, mentre un cordone troppo corto può provocare un distacco prematuro della placenta durante l'espulsione del feto. Il cordone ombelicale risulta essere completamente rivestito dall'amnios. È liscio, lucente, semirigido, flessibile e molto resistente, potendo sopportare una trazione di oltre 5 kg di peso. Può inserirsi al centro della placenta (in circa il 20% dei casi), ma è più spesso eccentrico (70%), più raramente si può trovare sul margine (5-10%) o addirittura al di fuori sul corion (inserzione velamentosa, circa 1%).

All'interno del cordone ombelicale decorrono i vasi ombelicali, in origine sono 4 (due arterie e due vene) in seguito le vene si fondono fra loro. Nelle arterie ombelicali circola sangue venoso che torna alla madre per l'eliminazione dei cataboliti prodotti dal feto, nella vena ombelicale circola sangue arterioso ricco di nutrimento. I vasi del cordone ombelicale sono immersi nella **gelatina di Wharton**: un tessuto connettivo mucoso, con po-

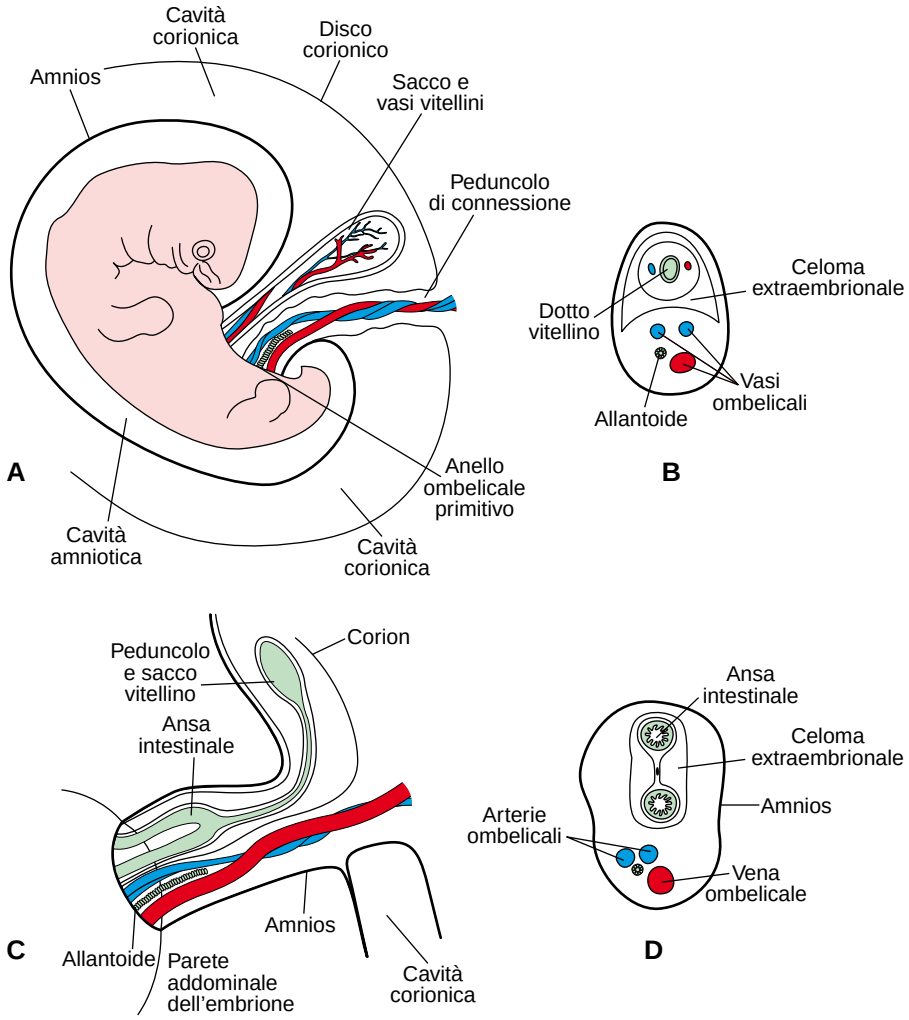



**Figura 20-8** ■ *A)* Disegno schematico delle strutture presenti all'interno del cordone ombelicale di un embrione di 5 settimane viste in sezione longitudinale *(A)* e trasversale *(B)*. Si può notare la regressione del sacco vitellino e dei suoi vasi. Disegno schematico di cordone ombelicale di un embrione di 10 settimane in sezione longitudinale *(C)* e trasversale *(D)*. Si noti nel cordone la protrusione di un'ansa intestinale dovuta al rapido sviluppo dell'intestino medio (ernia ombelicale fisiologica).

che fibre e ricco di acido ialuronico, che costituisce l'impalcatura del cordone ombelicale. La gelatina di Wharton ha la funzione di proteggere i vasi da possibili costrizioni e quindi impedire l'occlusione dei vasi stessi in caso di piegature del funicolo, determinate dai movimenti del feto. I vasi ombelicali si avvolgono a spirale intorno all'asse del cordone e a causa della loro tortuosità determinano delle varicosità lungo il cordone, i cosiddetti **falsi nodi**. A volte si formano anche dei nodi veri (circa 1% delle nascite), raramente fatali perché la gelatina di Wharton di solito impedisce la totale occlusione dei vasi (Fig. 20-9).

## LA CIRCOLAZIONE PLACENTARE

Il sangue materno arterioso attraverso 80-100 arterie spirali uterine, divenute larghe e beanti, si riversa negli spazi intervillosi, in cui pescano i villi coriali fetali. La circolazione materna è il risultato di una differenza di pressione: elevata nelle arterie spirali (70 mm/Hg) e bassa nelle lacune (10 mm/Hg). Il sangue materno entra con forza nelle lacune per poi circolare più lentamente intorno ai villi coriali favorendo la scambio di metaboliti e cataboliti. Il sangue materno defluisce poi verso la decidua dove si aprono le vene endometriali. In queste vene la pressione arteriosa è ancora più bassa (circa 8 mm/Hg), quindi il sangue viene risucchiato in esse e immesso nella circolazione materna (Fig. 20-10).

I villi della placenta sono vascolarizzati dalle arterie ombelicali e dalla vena ombelicale: nella maggior parte dei casi le arterie che dal feto vanno alla placenta sono due; una è invece la vena che dalla placenta va al feto. La vena ombelicale porta il sangue arterioso dalla placenta al feto mentre le arterie ombelicali portano il sangue ve-

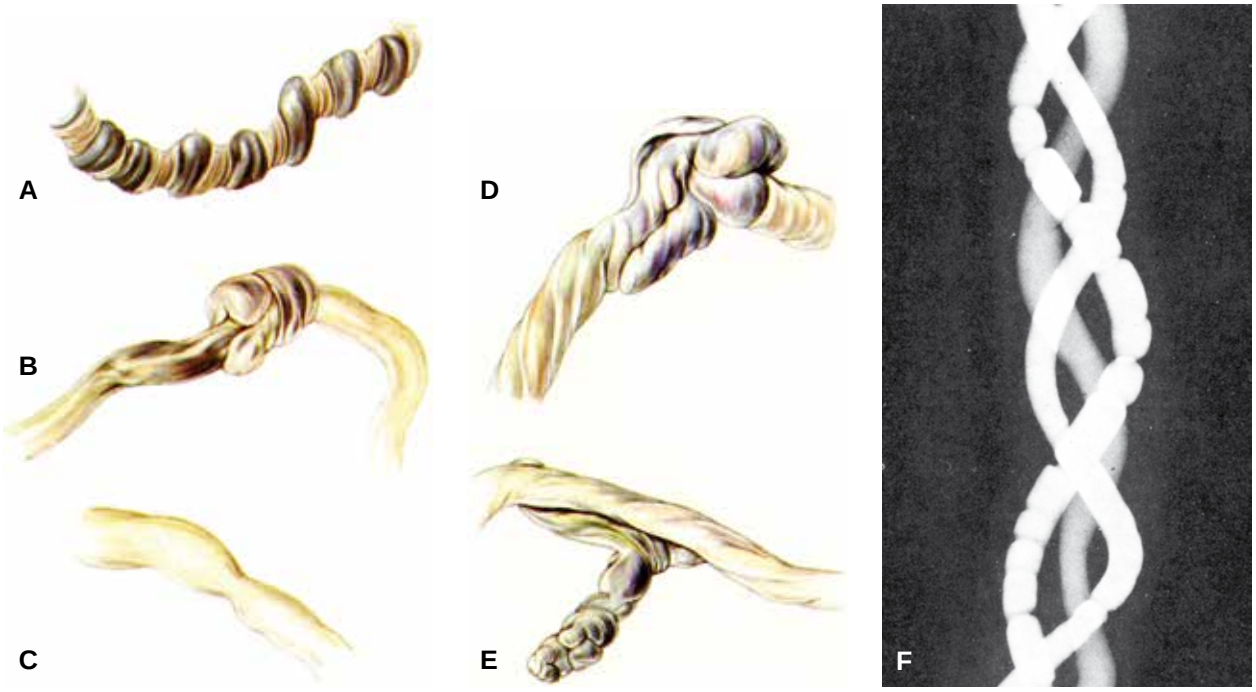



**Figura 20-9** ■ Disegni rappresentanti alterazioni del cordone ombelicale. *A)* iperspiralizzazione delle arterie; *B)* nodo vero; *C)* restringimento del cordone; *D,E)* due falsi nodi. *F)* Radiografia di un tratto di cordone ombelicale che mostra l'attorcigliamento a spirale delle arterie e i falsi nodi. (I disegni sono tratti da G.M. Mariuzzi, Anatomia patologica, Piccin Nuova Libraria, 2007. La figura *F* è tratta da W.J. Hamilton, J.D. Boyd, H.W. Mossman, Embriologia umana, Piccin Nuova Libraria, 1977).

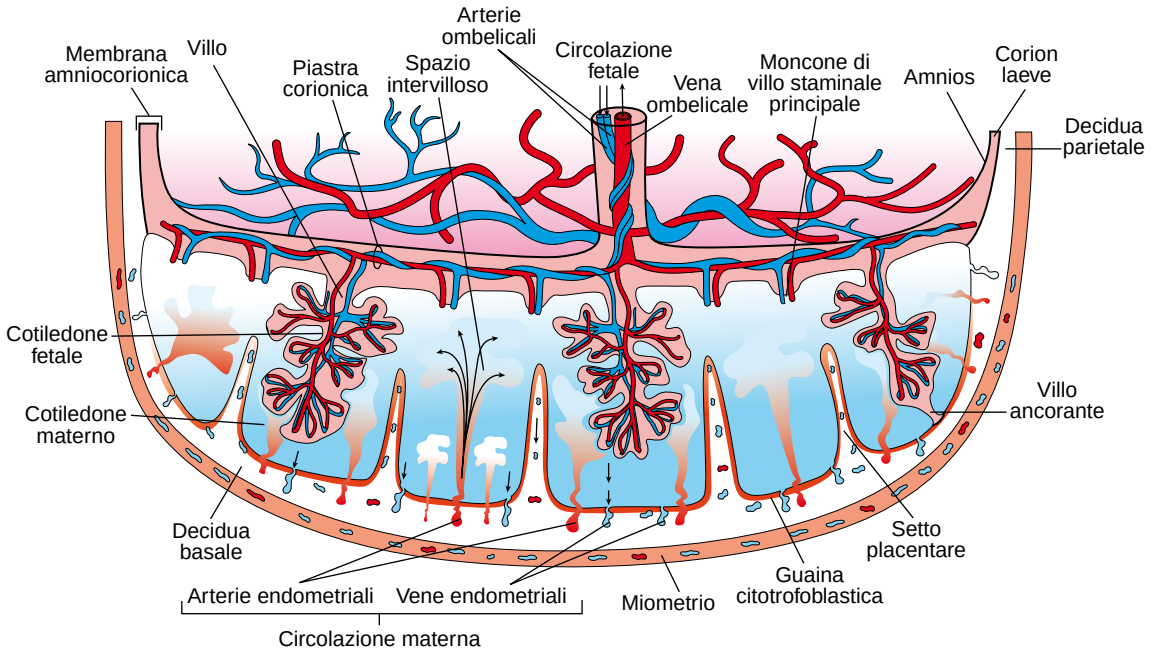



**Figura 20-10** ■ Spaccato di placenta umana a termine che mostra la circolazione del sangue materno nei compartimenti creati dai setti placentari della decidua (cotiledoni materni). Nella porzione materna sono visibili le arterie endometriali che si aprono nelle lacune sanguigne della placenta e le vene endometriali che raccolgono il sangue refluo. All'interno delle lacune si espandono i villi fetali altamente ramificati per aumentare la superficie di scambio tra madre e feto.

noso refluo dal feto alla placenta, dove si avrà il passaggio di anidride carbonica e prodotti del catabolismo fetale dal circolo fetale a quello materno.

Le sostanze nutritizie, l'ossigeno, gli ormoni, le immunoglobuline IgG passano dal sangue materno a quello fetale. È da ricordare che in condizioni fisiologiche non vi è mai mescolamento tra il sangue materno e quello fetale. I tessuti che separano i due flussi sanguigni materno e fetale, formano la cosiddetta **barriera ematoplacentare**. Questa inizialmente è composta da quattro strati: il rivestimento endoteliale dei vasi fetali, il tessuto connettivo dell'asse del villo, lo strato citotrofoblastico e il sincizio. Dal 4° mese in poi tuttavia l'endotelio dei vasi si pone in intimo contatto con il sincizio e aumenta notevolmente la velocità di scambio.

Il circolo sanguigno placentare materno aumenta notevolmente durante la gravidanza. Questo è dovuto sia alla crescita di vasi sanguigni nel sito dell'impianto (angiogenesi) dopo che è avvenuta la reazione deciduale, ma anche a una significativa vasodilatazione che risulta in un aumento di flusso sanguigno. La dilatazione delle arterie spirali dell'utero è stata attribuita sia all'azione invasiva delle cellule polinucleate giganti del trofoblasto che al rimodellamento delle arterie che perdono la loro parete muscolare liscia. Questa perdita di cellule muscolari sembra dipendere dall'azione dai linfociti NK uterini (uNK), presenti nella zona dell'impianto.

Lo sviluppo dei vasi sanguigni viene stimolato dalle cellule del trofoblasto che producono numerosi fattori angiogenici e vasodinamici. Tra questi il più noto è il VEGF che, oltre al suo ruolo come fattore promovente lo sviluppo dei vasi sanguigni, causa anche instabilità delle strutture dei vasi aumentando così la permeabilità vascolare.

In condizioni normali le lacune sanguigne contengono complessivamente circa 150 ml di sangue che viene continuamente rinnovato con un rapido flusso che permette il passaggio di circa mezzo litro di sangue per minuto. Il benessere dell'embrione dipende da un'adeguata irrorazione dei villi embrionali da parte del sangue materno. Una riduzione della circolazione uteroplacentare porta ad ipossia dell'embrione con un conseguente ritardo dell'accrescimento intrauterino; riduzioni più significative possono portare alla morte del feto.

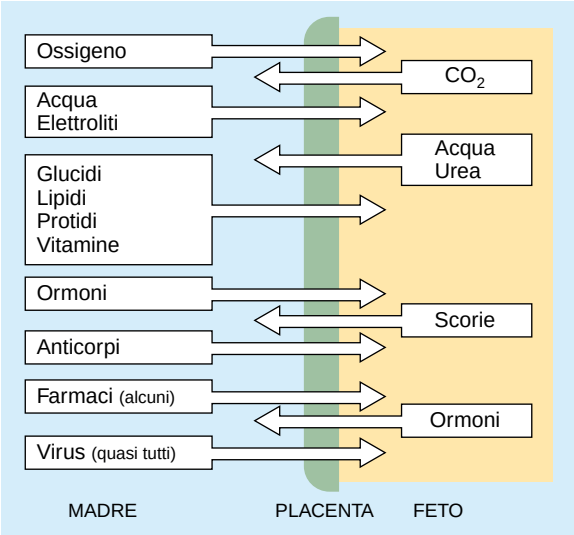



**Figura 20-11** ■ Schema che mostra lo scambio di sostanze tra madre e feto.

## FUNZIONI DELLA PLACENTA

La placenta svolge quattro principali funzioni:

- sintesi di metaboliti;
- scambi metabolici e gassosi tra madre e feto;
- passaggio di anticorpi materni al feto;
- produzione di ormoni

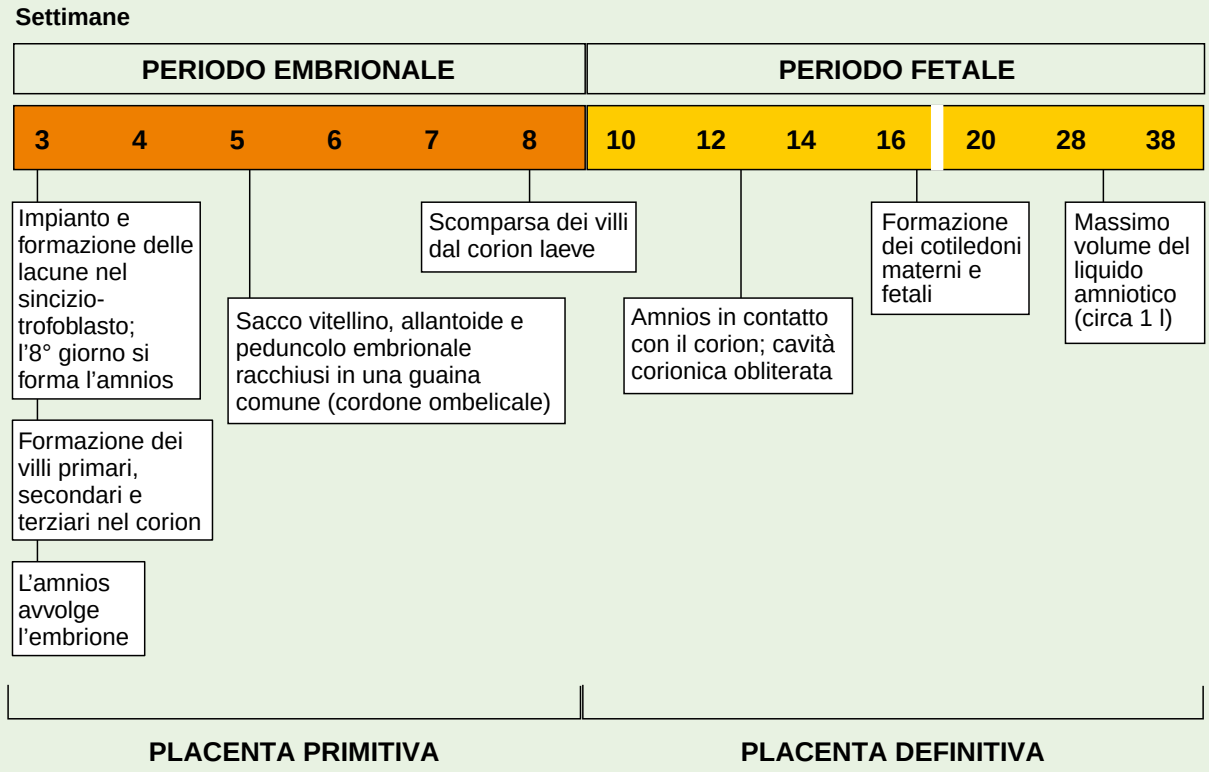
### Metabolismo placentare

La placenta, soprattutto all'inizio della gravidanza, sintetizza il glicogeno, il colesterolo e gli acidi grassi che servono come fonte di nutrimento per l'embrione e per la sintesi di membrane cellulari. La gravidanza comporta profonde modificazioni del metabolismo intermedio materno, tese a fornire continuamente al feto i substrati energetici di cui ha bisogno, essendo il feto totalmente dipendente dalla circolazione materna per il suo sviluppo. La placenta modula il trasferimento di substrati al feto. Tutti i nutrienti, gas, ormoni, elettroliti ed anticorpi che passano dalla madre al feto devono superare questa barriera. Dall'altra parte, tutti i prodotti di rifiuto dal sangue del feto devono passare al sangue materno attraverso questo filtro (Fig. 20-11). Il trasporto delle sostanze attraverso la membrana placentare è realizzato con diversi meccanismi. L'ossigeno e l'anidride carbonica passano per diffusione passiva. L'ossigeno diffonde dal sangue materno verso quello fetale che presenta una più bassa tensione d'ossigeno, il contrario avviene per l'anidride carbonica. L'acqua passa prevalentemente per osmosi sia nel sangue fetale che nell'amnios, dove serve per il ricambio del liquido amniotico. Gli elettroliti quali sodio potassio e cloro passano per diffusione passiva, mentre calcio e fosfati, che vengono accumulati preferenzialmente nel feto, probabilmente vengono trasportati per diffusione facilitata. Inoltre la placenta sintetizza e accumula glicogeno a partire dal glucosio. Questi zuccheri attraversano la membrana placentare con meccanismi di trasporto attivo. Sia gli aminoacidi–necessari per la sintesi proteica fetale che i precursori dei lipidi fetali (acidi grassi, etc.) attraversano la barriera placentare mediante trasporto attivo. Alcune proteine, tra cui gli anticorpi, come vedremo di seguito, possono attraversare la placenta senza venire degradate.

### Passaggio di anticorpi materni, virus e batteri patogeni

Il feto non ha un sistema immunitario funzionante e la madre lo protegge trasmettendogli i propri anticorpi (quelli della classe IgG). Il sinciziotrofoblasto presenta

## TABELLA CRONOLOGICA DELLO SVILUPPO TEMPORALE DEGLI ANNESSI EMBRIONALI




infatti i recettori Fc specifici per questa classe di immunoglobuline, che legano le IgG presenti nel sangue materno, consentendo loro di attraversare per transcitosi la barriera placentare. In tal modo la madre fornisce al feto una limitata immunità passiva contro diversi agenti patogeni ai quali la madre sia stata esposta o vaccinata (p. es. difterite e morbillo). Questi anticorpi permangono in circolo nel bambino per qualche mese dopo la nascita, proteggendolo da malattie infettive finché non diventa maturo il suo sistema immunitario. Infatti, i neonati iniziano precocemente a produrre le proprie immunoglobuline, ma i livelli adulti non sono raggiunti fino all'età di circa 3 anni (Fig. 20-12)

La placenta rappresenta inoltre un potente filtro per i parassiti del sangue, ma è meno efficace contro virus, batteri e sostanze tossiche trasmissibili al feto dalla madre. Tra i virus che possono attraversare la placenta e infettare il feto troviamo quelli della rosolia, della varicella-zoster, il citomegalovirus (responsabile di un tipo di mononucleosi [la mononucleosi classica è quella da Epstein-Barr]) e virus associati con il morbillo, il vaiolo, la poliomielite. Tra i batteri il *Treponema pallidum* che

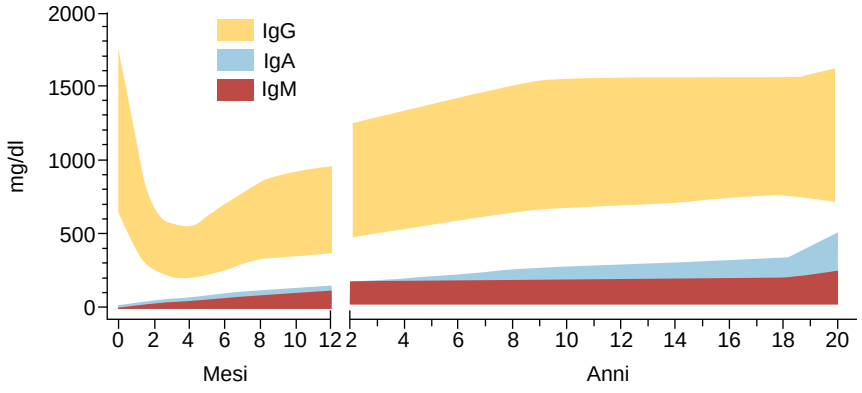



**Figura 20-12** ■ Livelli di immunoglobuline presenti nel sangue del bambino al momento della nascita e nei primi anni di vita.

causa la sifilide e il *Toxoplasma gondii*. Alcuni batteri e protozoi come il *Toxoplasma gondii* infettano la placenta creando lesioni e dopo attraversano la membrana placentare nelle fenditure che hanno determinato. Anche il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) può in alcuni casi attraversare la placenta da una madre infetta e infettare il feto in utero. Il virus può anche essere trasmesso durante il parto o con il latte materno durante l'allattamento al seno.

## Passaggio di farmaci e sostanze teratogene

La maggior parte dei medicinali e dei metaboliti degli stupefacenti attraversa la placenta senza difficoltà e può danneggiare seriamente l'embrione causando malformazioni congenite. Molti farmaci per uso terapeutico sono noti come teratogeni e la maggior parte di essi esercita un'azione teratogena durante il periodo embrionale. Anche alcune droghe come tabacco, alcool o cocaina sono teratogene. La cocaina assunta da donne in gravidanza attraversa facilmente la placenta e può causare dipendenza nel feto in via di sviluppo e nel neonato. Tossici ambientali quali il mercurio assunto dalla madre con l'alimentazione possono anch'essi attraversare la placenta e danneggiare lo sviluppo del feto.

## Produzione di ormoni

Le fasi iniziali della gravidanza dipendono dall'attività ormonale materna. Infatti, l'organo endocrino essenziale per il mantenimento delle fasi iniziali della gravidanza fino alla 7ª settimana, è il corpo luteo con la sua produzione di progesterone. Successivamente è la placenta ad assumere un ruolo endocrino fondamentale. Come descritto nel Capitolo 9, pochi giorni dopo la fecondazione, le cellule del citotrofoblasto cominciano a produrre l'ormone **hCG** (gonadotropina corionica umana) che stimola il corpo luteo a continuare a produrre il progesterone necessario al mantenimento dell'endometrio in fase secretiva. Nelle successive settimane, la placenta che si sta sviluppando comincia a produrre ormoni che riprogrammano la fisiologia della madre durante la gravidanza influenzando la crescita dei vasi sanguigni materni, l'ematopoiesi, la risposta immunitaria al feto, il metabolismo, la produzione di steroidi, il comportamento e lo sviluppo delle ghiandole mammarie, in modo da assicurare l'appropriato apporto di nutrienti e ossigeno necessari per l'accrescimento dell'embrione. La placenta produce sia ormoni proteici che steroidei (vedi "Processi e molecole").

## PROCESSI E MOLECOLE

### *Gli ormoni della placenta*

Gli **ormoni proteici** prodotti dalla placenta sono:

- la **gonadotropina corionica umana** (**hCG**) la cui funzione principale è appunto il mantenimento del corpo luteo;
- il **lattogeno placentare umano** (**hPL**) o somatomammotropina corionica umana (hCS) che stimola lo sviluppo della mammella e ha un'azione a livello del metabolismo degli zuccheri, riducendo nella madre la sensibilità all'insulina così da assicurare un continuo rifornimento di zuccheri al feto; alle volte induce diabete nella madre;
- la **tireotropina corionica umana** (**hCT**) ha un'azione TSH-simile e determina un aumento della secrezione dell'ormone tiroideo, che è importante perché stimola i processi cosiddetti "anabolici", cioè di crescita, sviluppo e movimento dell'organismo;
- la **corticotropina corionica umana** (**hCC**) che si ipotizza aumenti i livelli di colesterolo e di pregnenolone, necessari per "costruire" tutti gli altri ormoni steroidei della placenta.

Gli **ormoni steroidei** prodotti dalla placenta sono:

- il **progesterone** che può essere definito come l'"ormone della gravidanza". È infatti indispensabile per il suo mantenimento e la sua prosecuzione, tanto che la somministrazione di inibitori della sua sintesi o di anticorpi antiprogesterone provoca l'interruzione della gravidanza. Esso agisce sulla muscolatura dell'utero mantenendola in uno stato di relativa quiescenza ed atonia per la maggior parte della gravidanza. Tuttavia, la sua funzione essenziale sembra essere collegata alla sua capacità di inibire la risposta dei linfociti T cellulo-mediata, importante perché altrimenti il feto, che porta in sé per metà il patrimonio genetico paterno, potrebbe essere considerato come "estraneo" dall'organismo materno, e quindi venire attaccato dal sistema immunitario della madre;
- gli **estrogeni (estradiolo)** che aumentano il flusso di sangue utero-placentare e stimolano la crescita uterina e lo sviluppo della ghiandola mammaria.

L'attività di produzione degli ormoni steroidei da parte della placenta non segue i meccanismi convenzionali della produzione ormonale nelle varie ghiandole. Infatti, la placenta umana è una ghiandola endocrina incompleta perché manca di alcuni degli enzimi necessari per la sintesi "de novo" degli estrogeni a partire dal colesterolo. Il surrene sia della madre, ma in misura maggiore il surrene del feto, sintetizza il deidroepiandosterone (DHEA) che servirà come precursore per la formazione di estrogeni da parte della placenta. La placenta e il feto rappresentano quindi dal punto di vista endocrino una struttura unitaria chiamata **unità feto-placentare**.

Infine la placenta produce **α-endorfine**, polipeptidi che causano vasodilatazione, e **prostaglandine**, acidi grassi derivati dall'acido arachidonico, che sembrano essere coinvolte nel proseguimento della gravidanza e nell'inizio del travaglio del parto.

### *Immunità e sviluppo dell'embrione*

La sorveglianza immunitaria è parte integrante della gravidanza e la placenta svolge l'importante funzione di proteggere l'embrione in sviluppo dall'attacco del sistema immunitario materno.

Durante la gravidanza le cellule fetali del trofoblasto invadono la decidua materna, ma pur esprimendo in maniera preferenziale geni paterni in conseguenza dell'imprinting (vedi Capitolo 9) e quindi potendo essere considerato un tessuto semi-allogenico, il trofoblasto non viene attaccato dal sistema immunitario materno. Molteplici meccanismi sono implicati nella mediazione della tolleranza feto/materna; il contributo di ogni meccanismo e le loro interazioni sono ancora oggetto di studio.

È certo che il sistema immunitario materno riconosce e reagisce agli antigeni fetali. Difatti, durante la gravidanza la decidua è popolata da numerosi leucociti materni. Nella specie umana le cellule ***natural killer* (NK)**, chiamate **uNK** (u = uterine), sono i leucociti più abbondanti nell'utero, costituendo circa il 70% della popolazione cellulare leucocitaria presente nel sito dell'impianto.

Tra i vari meccanismi locali attraverso i quali il trofoblasto riesce ad evitare l'attacco da parte del sistema immunitario materno un posto di rilievo spetta senza dubbio alla particolare configurazione delle molecole del **complesso maggiore di istocompatibilità di classe HLA-Ia**, espresse dal citotrofoblasto. Le cellule extravillose del citotrofoblasto, infatti, esprimono solo molecole HLA-Ia di tipo C e non A e B. Inoltre esprimono molecole HLA "non classiche" di classe Ib, le HLA-G e HLA-E. In entrambi i casi le HLA-I espresse dal trofoblasto attivano poco, o addirittura inibiscono, la risposta immunitaria della madre.

Le cellule NK esprimono sulla loro superficie una combinazione di recettori per queste molecole. I recettori che legano i differenti gruppi di aplotipi HLA-Ia di tipo C sono chiamati ***killer immunoglobulin-like receptors* (KIR)** e possono essere sia inibitori che attivatori. Sia le HLA-Ia di tipo C che i KIR mostrano un certo polimorfismo, ed è stato suggerito che certe combinazioni di particolari KIR con il loro ligando siano responsabili di difetti nell'invasione del trofoblasto.

Il recettore eterodimerico CD94/NKG2A per le HLA-E inibisce la risposta citolitica delle cellule NK. Anche le molecole HLA-G presenti sulle cellule extravillose del citotrofoblasto giocano un ruolo nella resistenza di queste cellule alla lisi mediata dalle cellule uNK, inibendone l'attività citolitica e la migrazione attraverso la placenta. Nuove evidenze suggeriscono che le cellule uNK svolgano un ruolo importante al momento dell'impianto per lo sviluppo della decidua e del trofoblasto. Infatti, le uNK attraverso la secrezione di citochine sono coinvolte nell'inizio dei cambiamenti della va-

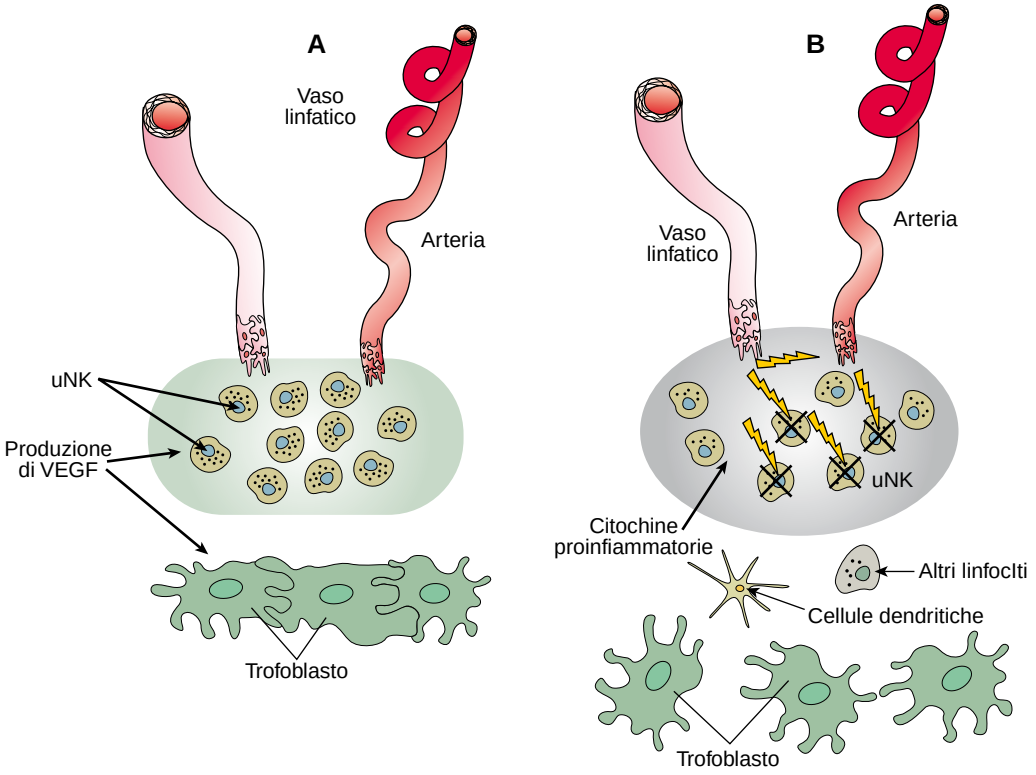



**Figura 20-13** ■ *A)* Modello di come le cellule uNK stimolino l'angiogenesi nella decidua materna. Le cellule uNK vengono attirate nel sito dell'impianto dove, insieme alle cellule del trofoblasto, secernono VEGF. Il VEGF prodotto crea un gradiente che induce la proliferazione e l'afflusso dei vasi dell'endometrio nel sito dell'impianto. *B)* Nel caso di fenomeni di necrosi o di stress del trofoblasto la produzione di citochine pro-infiammatorie determina fenomeni di morte cellulare a carico delle cellule del trofoblasto e delle uNK. Questo porta ad un calo della produzione di VEGF con conseguente blocco dell'angiogenesi e morte del feto.

scolarizzazione della decidua e dell'invasione del trofoblasto necessari per il successivo sviluppo della placenta. Esse possono controllare la funzione vascolare mediante la secrezione di fattori angiogenici e hanno un ruolo probabilmente anche nel permettere un buon apporto di nutrienti all'embrione modulando i cambiamenti strutturali delle arterie spirali uterine. Le uNK sono spesso localizzate vicino ai vasi sanguigni ed esprimono **VEGF (vascular endothelial growth factor)**, un potente fattore di crescita coinvolto nell'angiogenesi e nell'induzione di un'aumentata permeabilità vascolare (Fig. 20-13).

I **linfociti T** sono un'altra popolazione di cellule immunocompetenti presenti nella decidua materna, con un ruolo rilevante nella risposta immunitaria gravidica. Anche questi elementi cellulari sono in stretto contatto con il trofoblasto, ma non riconoscono come estranee le cellule trofoblastiche, in quanto queste mancano delle proteine HLA-Ia di tipo A e B.

Un altro meccanismo di difesa del trofoblasto è dato dalla produzione di molecole repressive secrete localmente dalla placenta come:

- il **TGFβ2 (transforming growth factor β2)**, prodotto dal trofoblasto e da cellule della decidua basale;
- il **PIBF (progesterone-induced blocking factor)** prodotto in presenza di progesterone dai linfociti di donne gravide, che è in grado di inibire diversi tipi di risposta mediata dal linfociti Th;
- l'**Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)** un enzima che degrada l'aminoacido essenziale triptofano generando metaboliti a valle di quest'ultimo. È espresso dalle cellule citotrofoblastiche sia del villo che extravillose e può inibire l'attivazione dei linfociti T materni privandoli del triptofano, aminoacido necessario per la loro proliferazione.

Riassumendo possiamo concludere che le cellule del trofoblasto non vengono riconosciute come estranee a seguito di due principali meccanismi: 1) esse esprimono HLA-I che attivano poco o non attivano affatto o addirittura inibiscono i linfociti uNK e i linfociti T; 2) produzione locale di molecole immunosoppressive.

## ASPETTI CLINICI

### *Preeclampsia*

La **preeclampsia** è una sindrome specifica della gravidanza, che si manifesta più frequentemente nelle primipare, per fenomeni immunologici dipendenti dal partner maschile, che diventano poi marginali nelle gravidanze successive, lasciando ipotizzare lo sviluppo di un meccanismo immunologico protettivo nei confronti degli antigeni paterni. La preeclampsia è caratterizzata dalla comparsa di proteinuria di grado elevato (alte concentrazioni di proteine nelle urine) e ipertensione in una donna, dopo la ventesima settimana di gravidanza. Nell'insorgenza della preeclampsia centrale è il ruolo della placenta: la presenza della struttura placentare è indispensabile per l'insorgenza della patologia, mentre la presenza del feto è marginale, come è mostrato dall'insorgenza della preeclampsia anche in gravidanze molari (mola idatiforme, Capitolo 9). L'unica terapia realmente efficace per la risoluzione della preeclampsia è il parto, ma solo se seguito dalla piena espulsione della placenta.

Nella patogenesi della preeclampsia è implicato un ridotto sviluppo placentare, dovuto ad una inadeguata capacità invasiva del trofoblasto, che determina a sua volta un inadeguato rimodellamento delle arterie spirali materne, che normalmente devono essere convertite in strutture vascolari a bassa resistenza e ampia capacitanza, attraverso la progressiva perdita della loro tonaca muscolare; questi due meccanismi, strettamente correlati, portano ad un insufficiente apporto di sangue alla placenta e al feto. Lo sviluppo della patologia si suddivide in due stadi. Nella prima metà della gravidanza (stadio 1) si ha l'alterata placentazione, che porta poi all'ischemia placentare con rilascio di fattori placentari, quali la forma solubile del recettore per il VEGF chiamato SFLT-1, l'endoglina (un co-recettore di TGFβ1) e detriti che stimolano una risposta infiammatoria materna e determinano disfunzione endoteliale sistemica (stadio 2), portando alla manifestazione clinica della malattia.

Molti meccanismi sono stati proposti per spiegare cosa controlli il grado di invasività del trofoblasto, incluse le molecole di istocompatibilità HLA-G e HLA-E. Anche le cellule uNK potrebbero essere coinvolte nell'insorgenza di questa patologia, attraverso un inappropriato supporto di citochine immunoregolative e fattori angiogenici. Un possibile modello sperimentale di preeclampsia è costituito dai topi mancanti di cellule NK, nei quali si manifestano dei gravi difetti riproduttivi dovuti a rilevanti anomalie della vascolatura e a una ridotta dimensione della placenta.

### *Amnios e liquido amniotico*

Nella 2ª settimana di sviluppo si comincia a formare la prima cavità amniotica, delimitata da cellule appiattite, gli amnioblasti (vedi Capitolo 9). Inizialmente gli amnioblasti sono in contatto con il citotrofoblasto ma successivamente, con la formazione del mesoderma extraembrionale, perdono la connessione con il trofoblasto. La cavità amniotica si espande progressivamente e con il ripiegamento dell'embrione, entro la 8ª settimana, lo circonda completamente, aderisce al corion e riveste il cordone ombelicale. L'espansione della cavità amniotica è dovuta principalmente all'aumento del **liquido amniotico**. Alla nascita il volume del liquido amniotico è di circa un litro. Il liquido amniotico è composto in gran parte di acqua, sali minerali, lipidi e proteine e, in piccola parte, dal passaggio di liquido dal sangue materno a livello della placenta. Il liquido amniotico viene completamente rinnovato in circa tre ore.

L'embrione contribuisce in modo sostanziale al mantenimento del volume di liquido nella cavità amniotica. Infatti, dopo la 16ª settimana il feto produce urina che aumenta il liquido amniotico. Volumi scarsi di liquido amniotico (**oligoidramnios**) si possono avere quindi sia nel caso di insufficienza del flusso di liquidi attraverso

la placenta che nel caso di **agenesia renale** (mancata formazione dei reni) o di ostruzione delle vie urinarie con conseguente assenza del contributo delle urine fetali al liquido amniotico. Il liquido amniotico prodotto in continuazione deve essere anche riassorbito. Questa funzione è svolta principalmente dall'embrione che ingerisce il liquido, e lo assorbe a livello intestinale; il liquido insieme ai prodotti di rifiuto in esso contenuti entra quindi nel circolo sanguigno fetale e viene infine trasferito alla circolazione materna attraverso la placenta, che svolge quindi funzioni di rene. Nel caso di problemi di riassorbimento del liquido si ha un forte aumento di volume e si parla di **polidramnios**.

Tra le funzioni del **liquido amniotico**, abbiamo: la sua capacità di proteggere, ossia di ammortizzare eventuali urti esterni, dovuta alla sua collocazione tra feto e pareti uterine, costituendo così uno strato isolante, protettivo; inoltre permette al feto una maggiore facoltà di movimento aiutandolo a sviluppare la muscolatura, ostacola la formazione di aderenze tra il corpo del feto e la parete; fa sì che la temperatura resti costante intorno al feto; impedisce qualsiasi processo di disidratazione ed è coinvolto nell'omeostasi dei liquidi e degli elettroliti. Durante il parto distribuisce sull'intera superficie del feto ogni aumento di pressione provocato dalle contrazioni uterine e, distendendo il collo dell'utero, gradualmente lo dilata.

## Le cellule staminali presenti nel sangue di cordone ombelicale

In Italia, a seguito della legge 40 del 2004, la sperimentazione sulle cellule staminali embrionali (ES) umane è vietata. Un'alternativa alle cellule ES è lo studio di cellule staminali presenti nei tessuti dell'individuo adulto e delle cellule staminali contenute nel sangue fetale del cordone ombelicale. Il sangue del cordone ombelicale contiene numerose cellule staminali (0,1-0,04% del totale delle cellule nucleate) capaci di dar origine sia in vitro che in vivo oltre che a cellule emopoietiche anche ad altri tipi cellulari (vedi sotto). Queste cellule sono facilmente isolabili mediante puntura dei vasi presenti nel cordone isolato al momento del parto. Le cellule vengono conservate in sacche contenenti anticoagulanti simili a quelle utilizzate per la raccolta del sangue e possono essere crioconservate per anni per un successivo trapianto sia nel donatore o in membri della sua famiglia sia in pazienti non correlati al donatore che risultino immunocompatibili. Uno dei maggiori vantaggi del sangue cordonale è comunque la ridotta capacità delle cellule estratte di produrre reazioni di rigetto.

In Italia le banche del sangue di cordone che ricevano una donazione lo conservano per donarlo a chi serve, e non è permesso farlo conservare per un futuro uso personale.

Nel sangue cordonale, oltre alle cellule staminali della linea emopoietica, sono presenti anche altri tipi di cellule staminali. Queste possono dare origine, se fatte opportunamente differenziare in vitro, a tipi cellulari diversi, quali cellule nervose, cardiomiociti, osteoblasti, cellule pancreatiche endocrine, cheratinociti, epatociti e cellule endoteliali. Queste cellule sono in pochi casi già utilizzate per fini di medicina rigenerativa, e si può ragionevolmente sperare che lo saranno ancor più in futuro per la terapia di malattie degenerative, quali la malattia di Parkinson, le malattie demielinizzanti e il diabete di tipo I (vedi Capitolo 4).

## Le cellule staminali nel liquido amniotico

La scoperta che anche il liquido amniotico contiene cellule staminali con capacità rigenerative simili alle cellule ES apre nuovi orizzonti per la cura di molte malattie e nel campo dei trapianti. Le nuove cellule, battezzate "staminali derivate dal liquido amniotico", si isolano facilmente (al momento dell'amniocentesi), si moltiplicano in fretta (raddoppiano in 36 ore) e sembrano versatili come quelle dell'embrione, potendo trasformarsi in cellule adulte muscolari, ossee, sanguigne, nervose, adipose, epatiche, la cui funzionalità rigenerativa è stata poi sperimentata con successo in vitro e su animali.

## Infezioni e gravidanza

Studi clinici hanno mostrato che un'alta percentuale di problemi in gravidanza quali aborto, parto prematuro, ritardo della crescita in utero e preeclampsia possono essere dati da infezioni intrauterine dovute a virus o batteri. Per questo, una pronta risposta a livello placentare contro i microrganismi è di grande importanza per il successo della gravidanza.

Il sistema immunitario innato rappresenta la prima linea di difesa contro patogeni. Le cellule del trofoblasto sono capaci di riconoscere e rispondere ad agenti patogeni con molecole di superficie caratteristiche delle cellule dell'immunità innata: i **recettori "toll-like" (TLR)**. Sul trofoblasto sono presenti numerosi tipi di TLR e l'attivazione di differenti TLR genera risposte differenti nelle cellule trofoblastiche. Si è visto ad esempio che il legame con TLR-4 promuove la produzione di citochine mentre il legame con il TLR-2 induce apoptosi nelle cellule del trofoblasto nel primo trimestre della gravidanza. Questo suggerisce che agenti patogeni attraverso la stimolazione del TLR-2 possano promuovere il forte aumento dell'apoptosi osservata nelle cellule del trofoblasto in un certo numero di complicanze della gravidanza.

Lavori recenti hanno suggerito un ruolo alternativo per il sistema immunitario innato materno. Infatti, il trofoblasto e il sistema immunitario materno agiscono insieme per la protezione contro microrganismi: quando il trofoblasto identifica molecole potenzialmente pericolo se, il sistema immunitario materno risponde in maniera coordinata (Fig. 20-14).

## Eritroblastosi fetale e il fattore Rh

Non sempre il passaggio di anticorpi dalla madre al feto risulta positivo. Si possono avere casi di incompatibilità materno-fetale dovuti ad incompatibilità sanguigna tra madre e feto, con un'immunizzazione della madre con-

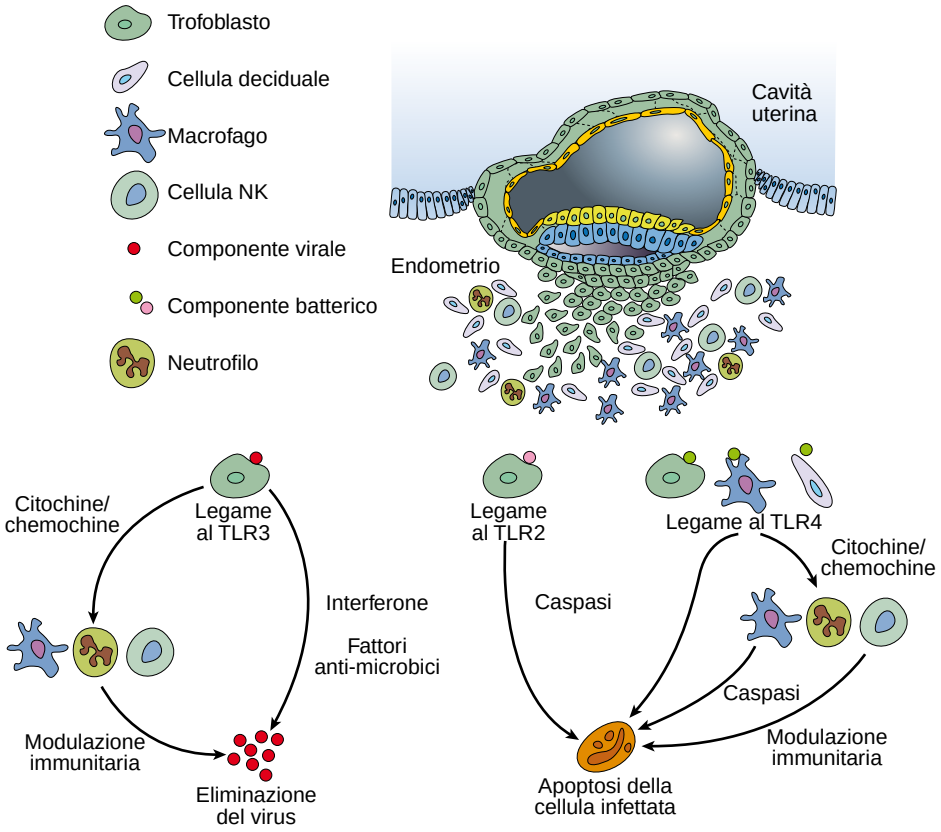



**Figura 20-14** ■ Il trofoblasto è in grado di riconoscere virus e batteri e reagire ad essi attraverso i TLR presenti sulla sua membrana cellulare. I virus vengono riconosciuti dai TLR3 e il trofoblasto reagisce producendo interferone e fattori antimicrobici che controllano l'infezione virale. In aggiunta il trofoblasto produce anche citochine in grado di modulare la risposta immunitaria materna. Nel caso di infezioni batteriche, il legame dei batteri con i TLR2 stimola la morte per apoptosi delle cellule trofoblastiche infettate, in caso di stimolazione dei TLR4 viene stimolata la produzione di citochine che modulano la risposta immunitaria materna con successiva distruzione della cellula infetta. La risposta infiammatoria iniziata nel trofoblasto attiva i macrofagi, le cellule NK e i neutrofili materni con effetto di danno per il feto.

tro un antigene legato ai globuli rossi fetali. Nella maggior parte dei casi l'antigene è il fattore **Rhesus** (**Rh**). Quando una donna Rh negativa concepisce un feto Rh positivo, sviluppa una risposta immunologica con anticorpi specifici anti-Rh. Infatti i globuli rossi fetali (incompatibili) possono attraversare la placenta e passare nel circolo materno durante tutta la gravidanza (il passaggio maggiore avviene comunque al momento del parto), stimolando la produzione di anticorpi materni contro il fattore Rh (isoimmunizzazione). Nelle successive gravidanze con feto Rh(+), gli anticorpi già presenti nella madre raggiungono il feto attraverso la placenta e provocano la lisi dei globuli rossi fetali. La gravità dell'isoimmunizzazione di solito aumenta ad ogni successiva gravidanza ed è probabile che la risposta immunitaria materna si faccia parallelamente sempre più intensa ad ogni successiva gravidanza

Questa condizione è nota come **malattia emolitica del neonato** o **eritroblastosi fetale**. L'anemia che ne deriva può essere così grave da provocare la morte in utero del feto. Per cercare di correggere l'anemia, si può trasfondere il feto in utero e poi il neonato con sangue Rh negativo, i cui globuli rossi non vengono attaccati dagli anticorpi materni non avendo il fattore Rh, oppure somministrando alla madre Rh negativa subito dopo il parto anticorpi anti-Rh che, distruggendo eventuali eritrociti fetali penetrati nella madre, ne impediscono la reazione immunitaria.

L'incompatibilità Rh indica di solito che sono presenti anticorpi contro l'antigene di superficie del globulo rosso di gruppo D. Le incompatibilità materno-fetali dei gruppi sanguigni ABO, che causano l'eritroblastosi fetale, sono meno gravi e meno frequenti rispetto a quelle del fattore Rh.

## *Placenta previa*

La placenta è solitamente inserita nella parte superiore dell'utero, lontano dal canale cervicale, cioè dall'apertura attraverso cui passa il neonato al momento del parto. In rare occasioni la placenta si inserisce invece nella parte più bassa dell'utero e blocca parzialmente (placenta

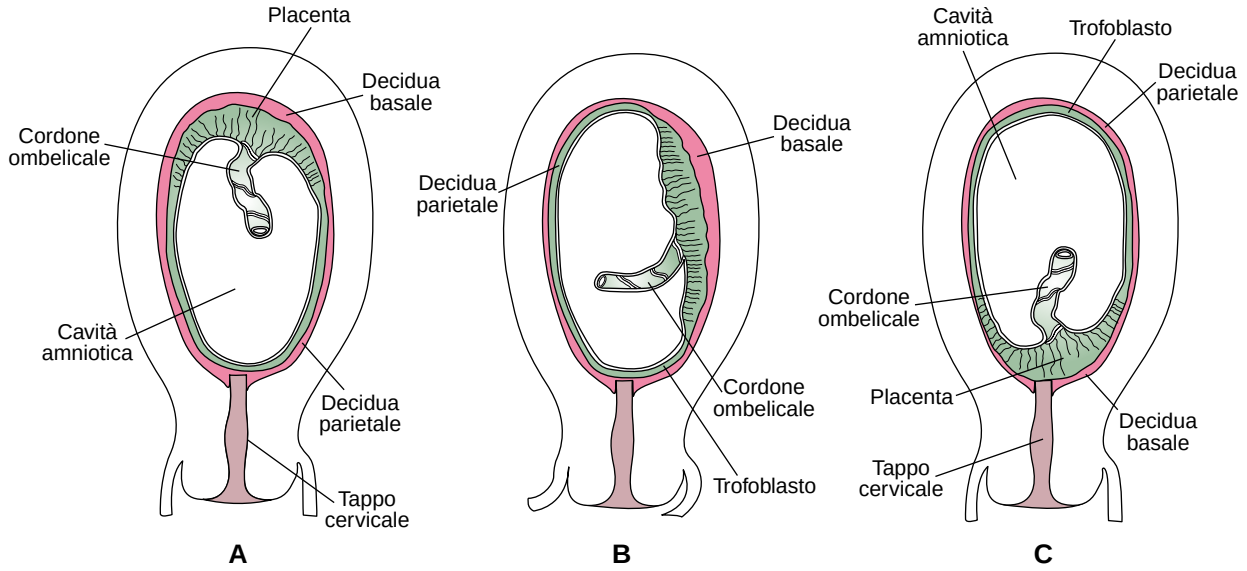



**Figura 20-15** ■ Disegno schematico che mostra i diversi possibili siti di impianto in utero della placenta. Il lume dell'utero è stato obliterato per l'apposizione e la fusione della decidua capsulare con la decidua parietale. In *(A)* la placenta è inserita sul fondo dell'utero, in *(B)* sulla parete posteriore, tali impianti rientrano nella norma. L'impianto è abnorme quando come in *(C)* la placenta copre l'orificio interno del canale cervicale: si parla di placenta previa. Questa placenta comporta rischi sia in gravidanza che al momento del parto.

previa parziale), o completamente l'accesso al canale cervicale (placenta previa totale) (Fig. 20-15).

All'inizio della gravidanza è comune trovare una forma di placenta previa, tuttavia a mano a mano che l'utero cresce l'inserzione placentare si sposta verso la parte più alta dell'utero e si allontana dalla cervice.

La placenta previa è causa di emorragie specialmente al momento del parto, quando il collo dell'utero si dilata. Per questo motivo solitamente la paziente viene sottoposta a taglio cesareo.

## *La placenta nei gemelli*

Della formazione dei gemelli si è trattato nel Capitolo 8. Per quanto riguarda la formazione della placenta nei gemelli dizigotici, essi hanno sempre corion e amnios separati. Nel caso di gemelli monozigotici la situazione varia a seconda dello stadio di sviluppo dell'embrione al momento della divisione. Nella maggior parte dei casi la divisione avviene in uno stadio di blastocisti precoce e i due embrioni che si formano presentano due sacchi amniotici, un unico sacco corionico e una placenta in comune. Più raramente, se la divisione avviene allo stadio di due cellule e l'impianto avviene separatamente, gli embrioni sviluppano due sacchi amniotici, due corion e due placente che a volte possono fondersi. In una bassa percentuale di casi i due gemelli monozigotici si formano dalla divisione del disco germinativo bilaminare e presentano una sola cavità amniotica in comune (Fig. 20-16). Nel caso che la divisione del disco embrionale non sia completa si formano dei **gemelli congiunti** o **siamesi**. I gemelli siamesi sono quindi coppie di gemelli identici congiunti in una parte più o meno consistente del corpo. La terminologia deriva dal celebre caso dei fratelli Chang ed Eng, originari del Siam, l'attuale Thailandia: i due uomini, uniti per il torace, vissero per 63 anni (dal 1811 al 1874), si sposarono con due sorelle ed ebbero numerosi figli. Alcuni gemelli possono essere separati con successo chirurgicamente. Tuttavia se le porzioni anatomiche comuni sono molto estese la divisione ha scarsa possibilità di sopravvivenza.

## *Il parto*

Il parto è quel processo durante il quale il feto, la placenta e le membrane fetali vengono espulsi dalle vie genitali della madre. Il progesterone prodotto dalla placenta ha la funzione di mantenere la gravidanza. Un calo di produzione di progesterone durante la gravidanza porta infatti all'aborto o al parto. Gli estrogeni hanno invece una funzione opposta. Durante le ultime 2-4 settimane della gravidanza il miometrio uterino subisce dei cambiamenti che lo preparano all'inizio del travaglio. Alla fine della 34ª-38ª settimana si aumenta la produzione da parte della placenta di **ormone di rilascio della corticotropina** (**CRH**) che stimola l'ipofisi anteriore a secernere l'**adrenocorticotropina** (**ACTH**) con conseguente aumento della steroidogenesi nelle ghiandole surrenali del feto. L'ACTH stimola la produzione di **cortisolo** da parte della corteccia surrenale che, oltre ad avere un effetto sulla maturazione dei polmoni aumentando la produzione di proteine surfattanti, a sua volta stimola la sintesi di prostaglandine da parte della placenta. Inoltre il DHEA e DHEAS (S = solfato) prodotti in maniera cre-

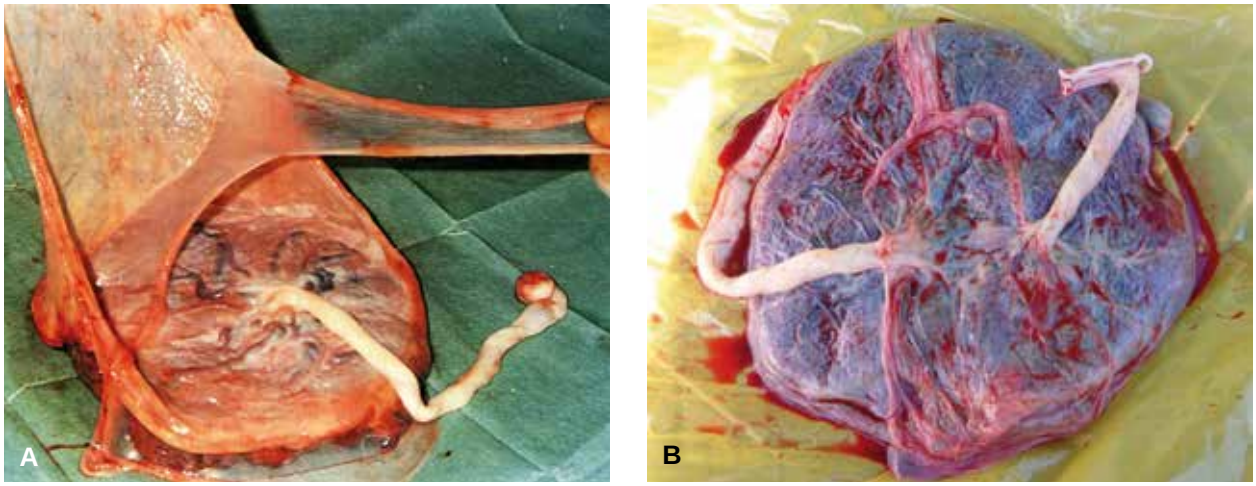



**FIGURA 20-16** ■ Fotografie di placente a termine viste dal versante fetale che mostrano i vasi sanguigni fetali che convergono a formare i vasi ombelicali. *A)* Placenta da gravidanza singola mostrante la presenza di un solo cordone ombelicale (*da* D. Berlingieri, Ginecologia e ostetricia, Piccin Nuova Libraria, 1993). *B)* Placenta di gemelli monozigoti. Gli embrioni erano posizionati ognuno in un proprio sacco amniotico, ma condividevano la stessa placenta (gravidanza monocoriale, biamniotica) come mostrato dalla presenza di due cordoni ombelicali inseriti in un'unica placenta (*Da* midwifemuse.wordpress.com, per gentile concessione).

scente da parte del surrene del feto vengono metabolizzati dalla placenta in estrogeni. L'ipofisi posteriore produce l'**ossitocina** che induce contrazioni della muscolatura uterina e stimola la produzione da parte della decidua di **prostaglandine**, che insieme agli estrogeni amplificano la capacità del miometrio a rispondere all'ossitocina (Fig. 20-17). A questo punto, come conseguenza anche della diminuita capacità del progesterone di mantenere il rilasciamento dell'endometrio, inizia il travaglio che può essere diviso in tre fasi. In una prima fase, detta di **dilatazione**, si ha una progressiva dilatazione del collo dell'utero. Questo stadio ha una durata variabile e può andare in media dalle 12 ore per una donna alla prima gravidanza a circa 7 ore per le successive gravidanze. Questa fase è innescata dalle contrazioni uterine che forzano il sacco amniotico contro il canale cervicale.

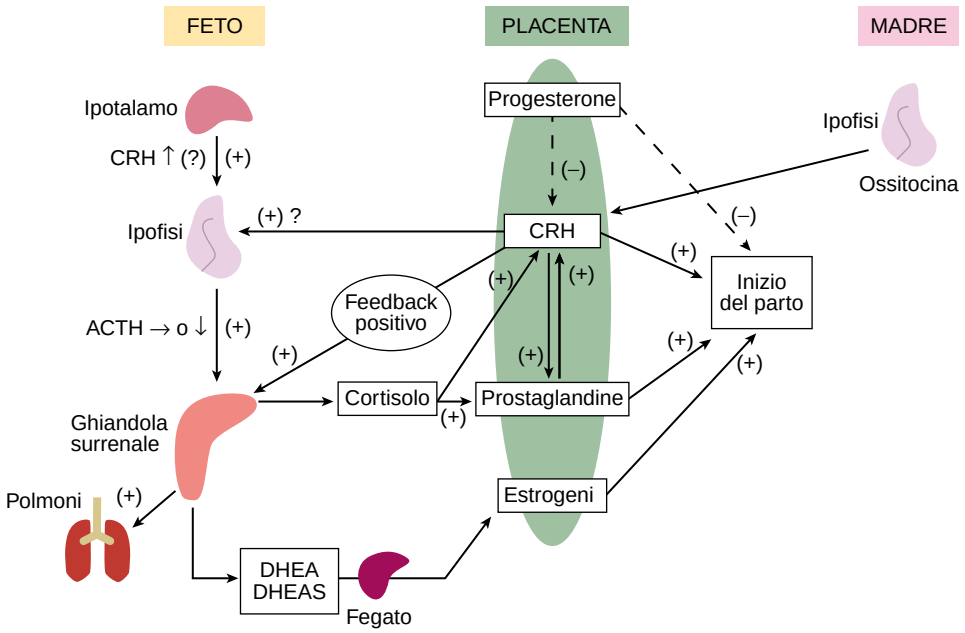



**FIGURA 20-17** ■ Rappresentazione schematica della cascata di segnali nell'unità feto-placentare al termine della gravidanza. È indicata anche la produzione di ossitocina prodotta dall'ipofisi della madre.

Quando il collo è completamente dilatato, inizia una fase di **espulsione** del feto attraverso il canale cervicale e la vagina. In questa seconda fase continuano le contrazioni uterine ma giocano un ruolo importante anche le contrazioni della muscolatura addominale. Segue poi una fase **placentare** con l'espulsione o **secondamento** degli annessi fetali (placenta, cordone, membrane amniocoriali). Le contrazioni uterine durano ancora per qualche tempo dopo il secondamento della placenta e delle membrane fetali: comprimendo le arterie spirali, che portavano il sangue nello spazio intervilloso, le contrazioni hanno il fine di prevenire un'eccessiva emorragia uterina.

## Bibliografia citata nel testo e letture consigliate

Abrahams VM e coll. First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. Molecular Human Reproduction 10, 55-63, 2004.

Abrahams VM, Mor G. Toll-like receptors and their role in the trophoblast. Placenta 26, 540-547, 2005.

Bischof P, Irminger-Finger I. The human cytotrophoblastic cell, a mononuclear chameleon. International Journal of Biochemistry & Cell Biology 37, 1-16, 2005.

Caniggia I e coll. Oxigen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia. Placenta 21, Suppl A, S25-S30, 2000.

Cross JC e coll. Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. Molecular and Cellular Endocrinology 187, 207-212, 2002.

Croy BA e coll. Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones. Immunological Reviews 214, 161-185, 2006.

Hanna J e coll. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. Nature Medicine 12, 1065-1074, 2006.

Hiby SE e coll. Combinations of maternal KIR and fetal HLAC genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. Journal of Experimental Medicine 200, 957-965, 2004.

Hiby SE e coll. Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage. Human Reproduction 23, 972-976, 2008.

Ishimoto H e Jaffe RB Development and function of the human fetal adrenal cortex: A key component in the feto-placental unit. Endocrine Reviews 32, 317-355, 2011

Kingdom J e coll. Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 92, 35-43, 2000.

Koga K, Mor G. Toll-like receptors and pregnancy. Reproductive Science 14, 297-299, 2007.

Koga K, Mor G. Expression and function of toll-like receptors at the maternal-fetal interface. Reproductive Science 15, 231-242, 2008.

Linzer DI, Fisher SJ. The placenta and the prolactin family of hormones: regulation of the physiology of pregnancy. Molecular Endocrinology 13, 837-840, 1999.

Manaster I e coll. Endometrial NK cells are special immature cells that await pregnancy. Journal of Immunology 181, 1869-1876, 2008.

Manaster I, Mandelboim O. The unique properties of human NK cells in the uterine mucosa. Placenta 29 Suppl A, S60-S66, 2008.

Moffett A, Hiby SE. How Does the maternal immune system contribute to the development of pre-eclampsia? Placenta 28 Suppl A, S51-S56, 2007.

Mor G. Inflammation and pregnancy: the role of toll-like receptors in trophoblast-immune interaction. The New York Academy of Sciences 1127, 121-128, 2008.

Prusa AR e coll. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? Human Reproduction 18, 1489-1493, 2003.

Rocha V, Gluckman E. Clinical use of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. Biology of Blood and Marrow Transplantation 12, 34-41, 2006.

Siegel N e coll. Stem cells in amniotic fluid as new tools to study human genetic diseases. Stem Cell Review 3, 256-264, 2007.

Siegel N e coll. Human amniotic fluid stem cells: a new perspective. Amino Acids 35, 291-293, 2008.

Smits-Wintjens VE e coll. Rhesus haemolytic disease of the newborn: Postnatal management, associated morbidity and long-term outcome. Seminars in Fetal & Neonatal Medicine 13, 265-271, 2008.

Zhang J e coll. Uterine natural killer cells: their choices, their missions. Cellular & Molecular Immunology 2, 123-129, 2005.